

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Mikuláš Vlk

STUDIUM VYUŽITÍ DERIVATIZAČNÍCH REAKCÍ PRO ESI-  
MS ANALÝZU OBTÍŽNĚ IONIZOVATELNÝCH ARYL  
CHLOROKOMPLEXŮ RHENIA

Study of derivatization reactions for ESI-MS analysis of hardly  
ionizable rhenium aryl chlorocomplexes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Martin Štícha Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Praha 2020

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. srpna 2020

## **Abstrakt**

Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem je metoda vhodná pro strukturní analýzu koordinačních sloučenin s výbornou citlivostí a selektivitou. Některé komplexní sloučeniny však nejsou pomocí měkkých ionizačních technik přímo ionizovatelné. Tato diplomová práce se zabývá zkoumáním derivatizační reakce obtížně ionizovatelných komplexů komplexy rhenia s 1,2-dihydroxybenzem a 2,3-dihydroxytoluenem a strukturní analýzou produktů. Struktura a fragmentační mechanismy připravených derivátů byly zkoumány pomocí kolizně indukované disociace (CID). Teorie funkcionálu hustoty (DFT) byla použita pro predikci štěpených vazeb při fragmentaci na základě prodloužení vazeb během ionizace a pro popis struktury připravených komplexů.

## **Klíčová slova**

Komplexy rhenia, strukturní analýza, ESI-MS, derivatizace, fragmentace, výpočetní chemie, DFT, CID, kolizně indukovaná disociace

## **Abstract**

Mass spectrometry with electrospray ionization is an excellent method for structural analysis of coordination compounds with outstanding sensitivity and selectivity. However, it fails to detect some low-polar rhenium complexes. This master thesis describes derivatization method of non-ionizable rhenium complexes with 1,2-dihydroxybenzene and 2,3-dihydroxytoluenene. Fragmentation mechanisms and structure of prepared complexes was studied using high resolution mass spectrometry and collision-induced dissociation (CID). Furthermore, density functional theory (DFT) computational method was used for prediction of bond cleavage based on bond lengthening.

## **Keywords**

Rhenium complexes, structural analysis, ESI-MS, derivatization, fragmentation, computational chemistry, DFT, CID, collision-induced dissociation

## Obsah

Abstrakt .....	3
Klíčová slova.....	3
Abstract .....	3
Keywords.....	3
Obsah.....	4
1. Cíle práce.....	8
2. Teoretický úvod .....	9
2.1. Komplexy rhenia .....	9
2.2. Měkké ionizační techniky .....	9
2.3. Ionizace za atmosférického tlaku .....	10
2.3.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	10
2.3.2. Fotoionizace za atmosférického tlaku.....	11
2.3.3. Ionizace elektrosprejem .....	12
2.3.3.1. Model vypaření iontu.....	14
2.3.3.2. Model zbytkového náboje.....	15
2.3.3.3. Model vypuzení řetězce .....	16
2.4. Derivatizace látek obtížně ionizovatelných v ESI.....	17
2.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie .....	19
2.5.1. Kolidně indukovaná disociace .....	20
2.6. Výpočetní chemie.....	22
2.6.1. Metody funkcionálu hustoty .....	22
2.6.2. Studium fragmentace využitím výpočetních metod.....	23
3. Experimentální část .....	25
3.1. Použité chemikálie .....	25
3.2. Přístroje a programy .....	25
3.3. Příprava komplexů a derivatizace .....	25

3.1.	Kinetická měření .....	26
3.2.	Výpočty DFT.....	26
3.3.	Podmínky měření .....	26
4.	Výsledky a diskuse .....	27
4.1.	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením .....	27
4.2.	Reakční kinetika .....	28
4.3.	Kolizně indukovaná disociace.....	31
4.4.	Výpočty DFT.....	34
4.4.1.	Optimalizace struktury .....	34
4.4.2.	Změna délky vazby .....	35
4.4.1.	Změna dihedrálního úhlu .....	37
5.	Závěr.....	40
6.	Použitá literatura.....	41
7.	Přílohy .....	50
7.1.	Příloha A – CID diagramy .....	50
7.2.	Příloha B – MS/MS spektra .....	53
7.3.	Příloha C – Fragmentační schémata.....	55

## Seznam zkratek

AM1	výpočetní metoda Austin Model 1
AO	atomový orbital
APCI	atmospheric pressure chemical ionization – chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	atmospheric pressure ionization – ionizace za atmosférického tlaku
APPI	atmospheric pressure photoionization – fotoionizace za atmosférického tlaku
Cat	katechol (1,2-dihydroxybenzen)
CA	collisional activation – kolizní aktivace
CAD	collisionally activated dissociation – kolizně aktivovaná disociace
<i>CE</i>	collision energy – laboratorní kolizní energie
CEM	chain ejection model – model vypuzení řetězce
CI	chemická ionizace
CID	collision induced dissociation – kolizně indukovaná disociace
CRM	charge residue model – model zbytkového náboje
DFT	density functional theory – teorie funkcionálu hustoty
DHN	dihydroxynaftalen (2,3-dihydroxynaftalen)
DHT	dihydroxytoluen (4-methyl-1,2-dihydroxybenzen)
$E_{CM}$	center of mass energy – těžišťová kolizní energie
EI	elektronová ionizace
ESI	electrospray ionisation – ionizace elektrosprejem,
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
FAB	fast atom bombardment – ionizace urychlenými atomy
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HF	Hartreeho-Fockova metoda
HPLC	high-performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	high resolution mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností
IEM	ion evaporation model – model vypaření iontu

MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - ionizace laserem za přítomnosti matrice
MD	molekulární dynamika
MO	molekulový orbital
MO-LCAO	molekulové orbitaly – lineární kombinace atomových orbitalů
PBrA	p-bromoanilin
PClA	p-chloroanilin
PIPA	p-isopropylanilin
PT	p-toluidin; p-methylanilin
Q	kvadrupól, kvadrupólový analyzátor
<i>SI</i>	similarity index – index podobnosti
SID	source-induced dissociation
STO	Slater orbitaly
TEA	triethylamin
TOF	time of flight – hmotnostní analyzátor doby letu

## 1. Cíle práce

Cílem této práce bylo studium derivatizační reakce umožňující využít hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem k detekci a studiu některých obtížně ionizovatelných komplexů rhenia. Vzhledem k barevnosti vznikajících produktů měl být průběh těchto derivatizačních reakcí studován i pomocí spektrofotometrických metod. Další pozornost měla být zaměřena na studium chování připravovaných komplexů v kolizní cele a na interpretaci fragmentačních schémat. V neposlední řadě měla být prozkoumána možnost využití výpočetní chemie ke zkoumání struktury vzniklých komplexů a predikci vazeb štěpených při fragmentaci na základě změny délky vazby během ionizace.



## 2. Teoretický úvod

### 2.1. Komplexy rhenia

Koordinční sloučeniny rhenia mají široké spektrum aplikací ve výzkumu i praxi. Patří mezi ně například vývoj léků a katalýza. Komplexy rhenia složené z  $\beta$ -emitujících izotopů  $^{186}\text{Re}$  a  $^{188}\text{Re}$  a vhodných organických ligandů našly díky svým unikátním vlastnostem využití v cílené chemoterapii [1, 2].

Podrobný výzkum zaměřený na fyzikálně-chemické vlastnosti komplexů obsahujících neradioaktivní rhenium odhalil nové aplikace v oblasti fyziky a chemie. Katalytická aktivita těchto komplexů pokrývá široké spektrum organických i anorganických reakcí. Bromotrikarbonyltetrahydrofuran rheniový komplex byl například využitý k efektivní katalýze v intra- a intermolekulárních annulačních reakcích při výrobě farmaceutik, funkčních materiálů a přírodních produktů [3]. Fotokatalytické vlastnosti komplexů  $\text{Re}^I$  s různými ligandy byly úspěšně využity pro generování vodíku z vody [4]. Dále byla také zjištěno, že jsou oxorheniové komplexy schopny katalyzovat různé reakce přenosu kyslíku a epoxidační reakce [5].

Důkladná analýza připravených komplexů rhenia je důležitým předpokladem pro jejich úspěšné využití. V minulosti skupina dr. Štíchy studovala strukturu komplexů  $\text{Re}^{V, VI, VII}$  s bidentátními aromatickými ligandy pomocí hmotnostní spektrometrie [6]. Mezi zkoumanými produkty reakcí a degradace byly pozorovány některé obtížně ionizovatelné sloučeniny [7]. Například komplex  $[\text{Re}^{VII}(\text{O})\text{Cl}(\text{cat})]$  nebylo možné ionizovat pomocí ESI, APCI ani APPI. Navíc vzhledem jeho nestabilitě zejména v protických rozpouštědlech bylo problematické i použití alternativních strukturně analytických metod.

### 2.2. Měkké ionizační techniky

Podle množství přidělené vnitřní energie lze ionizační techniky dělit na „tvrdé“ a „měkké“. V případě tvrdých ionizačních technik molekula získává velké množství přebytečné energie, která způsobí rozsáhlou fragmentaci ionizované molekuly. Naopak u měkkých ionizačních technik k tomuto jevu nedochází a vznikají převážně molekulární ionty. Jednou z prvních měkkých ionizačních technik je chemická ionizace (CI) [8]. Využití našla v plynové chromatografii s hmotnostní detekcí (GC-MS) společně s elektronovou ionizací (EI). Elektronová ionizace je tvrdou ionizační technikou produkující velké množství fragmentů a ve spektru tak může chybět molekulární ion [9, 10]. Míra fragmentace v CI je nízká,

molekulární ion má většinou vyšší relativní intenzitu [11, 12]. Tyto metody jsou však vhodné pouze pro analyty, které jsou těkavé a termálně stabilní. Molekuly nespĺňující tato kritéria musí být převedeny na ionty přímo z pevné, případně kapalně fáze. Iontové zdroje vytvářející ionty z kapaliny fungují převážně na principu zmlžování. Za atmosférického tlaku jsou z kapek vytvořeny ionty a ty jsou dále transportovány skrze mezifázi do vakuové části hmotnostního spektrometru. Do této skupiny iontových zdrojů patří chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a ionizace elektrosprejem (ESI). Princip těchto metod je popsán v následujících podkapitolách. Při generování iontů z pevné fáze je vzorek aplikován ve formě pevného netěkavého nánosu. Často je v kontaktu s pevnou nebo viskózní matricí. Vrstva vzorku je potom ozářena fotony v případě ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) nebo je ostřelována urychlenými atomy v případě FAB a následně dochází k desorpci iontů z povrchu vzorku. Ionty jsou pak elektrickým polem nesený k analyzátoru [9, 10].

Metody, které lze použít k ionizaci molekul studovaných v této práci jsou popsány v následujících podkapitolách.

### **2.3. Ionizace za atmosférického tlaku**

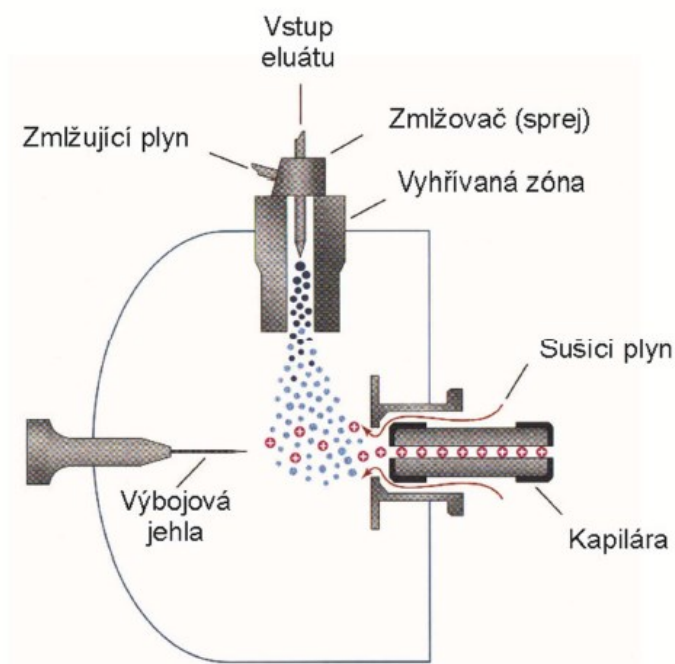
Při ionizaci za atmosférického tlaku (API) jsou vytvořené ionty transportovány do hmotnostního analyzátoru, který je umístěn ve vysokém vakuu ( $10^{-5}$  Pa). Toho lze dosáhnout pomocí přechodů mezi různými stupni vakua. Většinou jde o dva stupně s vlastními pumpami. Jednotlivé části jsou spojeny průchodkami s velmi malým průměrem, tzv. skimmery nebo iontovými nálevkami. Průměr otvorů pro průchod iontů musí být dostatečně široký, aby byla dosažena vysoká citlivost, ale zároveň nesmí být moc široký, aby bylo zajištěno dostatečné vakuum v prostoru hmotnostního analyzátoru [9, 13, 14].

Další problém nastává při přechodu iontů do vakuové části, při kterém dochází k ochlazení a nežádoucí tvorbě klastrů. Tvorbu klastrů lze zabránit protiproudem sušícího plynu, pro odstranění molekul rozpouštědla a vyhříváním iontového zdroje. Při teplotě zdroje mají vzniklé ionty dostatečnou teplotu i po přechodu do vakua [13–15].

#### **2.3.1. Chemická ionizace za atmosférického tlaku**

Metoda APCI pracuje na podobném principu, jako v GC-MS běžně využívaná CI. Hlavní využití APCI je pro ionizaci středně polárních až nepolárních látek s molekulovou hmotností až do 1500 Da. Tato ionizace poskytuje převážně ionty nesoucí jeden náboj [9, 15].

Ionizace pomocí APCI je používána ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) nebo s přímým nástřikem. Kapalina je při průtoku  $0,2 - 2 \text{ ml min}^{-1}$  přiváděna do zmlžovače, který pomocí plynu s vysokým průtokem vytvoří jemnou mlhu. Ta potom prochází komorou vyhřívanou na  $200-400 \text{ }^\circ\text{C}$ , kde se odpařuje rozpouštědlo. Na zahřátý plyn pak působí koronový výboj, čímž dochází k ionizaci (viz obrázek 1). V pozitivním módu vznikají ionty přenosem protonu nebo vznikem aduktů, v závislosti na protonové afinitě. V negativním módu pak vznikem aduktů nebo odtržením protonu.

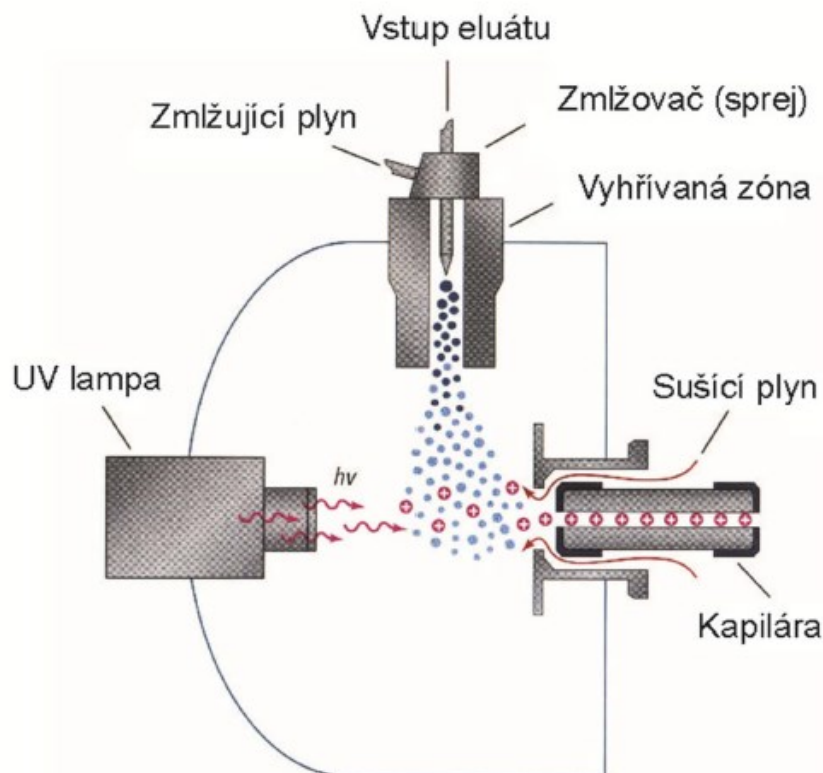


Obrázek 1 – Schéma zdroje APCI. Převzato a upraveno z [16].

### 2.3.2. Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) je jednou z nejmladších sprejovacích metod. Vzorek je zmlžen a odpařen stejným způsobem, jako v případě APCI. Molekuly v plynné fázi pak interagují s fotony, které emituje výbojka (viz obrázek 2). Nejčastěji se používá kryptonová výbojka s energií fotonů  $10 \text{ eV}$ . Její energie je příliš nízká k ionizaci molekul rozpouštědla a vzduchu, ale je dostatečná k ionizaci fotoaktivních molekul. Na rozdíl od ESI a APCI je APPI vhodná pro ionizaci málo polárních molekul. Ionizací mohou vznikat ionty s lichým počtem elektronů. Ke zvýšení citlivosti lze použít tzv. dopant. Jedná se o látku, která

má ionizační energii nižší než 10 eV. Pomocí ion-molekulárních reakcí s analytem dochází selektivně ke vzniku iontů [17–21].



Obrázek 2 – Schéma iontového zdroje APPI. Převzato a upraveno z [16].

### 2.3.3. Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) je jednou z nejvíce využívaných metod ionizace v chemické a biochemické analýze. Využitelnost vzrostla zejména poté, co bylo zjištěno, že s pomocí elektrospreje lze získat násobně nabitě ionty proteinů. Byla tak umožněna jejich analýza i s přístroji s nízkým rozsahem měřených hmot. Z počátku byla ESI považována za nástroj k ionizaci pouze proteinů. Později byla rozšířena na polymery, další biopolymery ale i malé polární molekuly. Ukázalo se také, že je s ESI možné dosáhnout vysoké citlivosti a nabízí snadné spojení s HPLC,  $\mu$ HPLC nebo kapilární elektroforézou [9, 22].

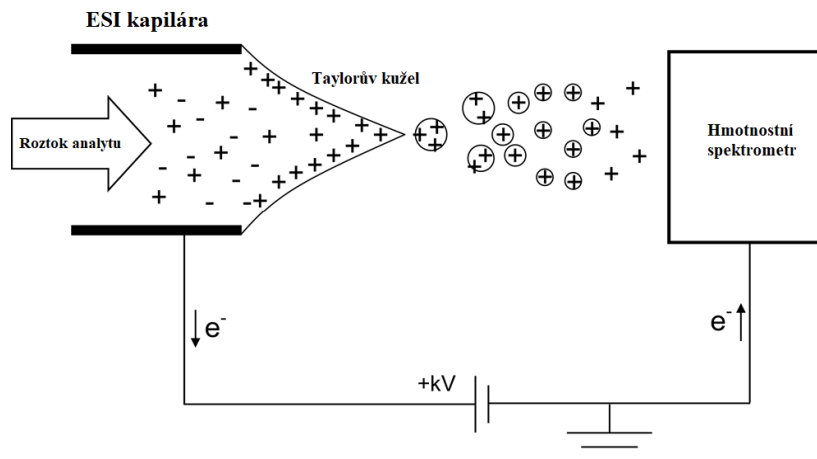
Použití elektrospreje jako metody pro rozptýlení homogenního kapalného vzorku je dlouho známá [22]. Fyzikální podstatu jako první popsal Sir Geoffrey Taylor [23]. O využití pro generování paprsků velkých molekul přemýšlel brzy po té Dole a kol. [24], nebyl však schopen svá tvrzení podepřít přesvědčujícím experimentem. Později Fenn a kol. [25, 26] ukázali, že je možné převést i velké molekuly (proteiny) do plynné fáze ve formě iontů bez jejich rozpadu. Elektrosprej se rychle rozšířil v oblasti bioanalýzy. Dnes je elektrosprej

nejrozšířenější technikou v MS analýze kapalných vzorků [22]. Mezi další výhody patří například univerzálnost, velmi nízká chemická specifita a tvorba velmi stabilních iontů.

Elektrosprej vzniká působením silného elektrického pole na kapalinu protékající skrze vodivou kapiláru za atmosférického tlaku [15]. Běžný průtok kapaliny se pohybuje v mezích 1-10  $\mu\text{l min}^{-1}$  a elektrosprej je tak vhodný pro spojení s kapalinovou chromatografií. Mezi kapilárou a válcovou elektrodou, které jsou od sebe vzdáleny 0,3 – 2 cm, je vloženo napětí 3-6 kV. Dochází ke vzniku elektrického pole o síle v řádu  $10^6 \text{ V m}^{-1}$ . Proti směru proudění kapek je zaveden tok sušícího inertního plynu o tlaku 1 atm, který urychluje odpařování rozpouštědla. Působením elektrického pole na kapalinu u špičky kapiláry vzniká mlha jemných kapiček. Při nízkém napětí je kapka na špičce kapiláry sférická. S rostoucím napětím se kapka deformuje a ztrácí svůj sférický charakter. Při vloženém napětí 1 až 2 kV dochází k prodloužení kapky vlivem náboje, který se koncentruje u hrotu. Při dostatečném napětí 3 až 5 kV dochází k překročení síly povrchového napětí kapky a vzniká Taylorův kužel (viz obrázek 3). Z jeho špičky jsou uvolňovány malé kapičky [9]. Vlivem sušícího plynu pak dochází k odpaření rozpouštědla a koncentrování náboje. Při dosažení Rayleighova limitu se vyrovnají Coulombické odpuzivé síly a povrchové napětí kapky a dochází k tzv. Coulombické explozi. Tato podmínka je definována Rayleighovou rovnicí [27, 28]:

$$Q_{Ry} = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (1)$$

Kde  $Q_{Ry}$  je náboj kapky,  $\gamma$  povrchové napětí rozpouštědla,  $R$  poloměr kapky a  $\epsilon_0$  permitivita. Kapka je roztržena, vzniká řada dalších kapek. První generace kapek vzniklých na špičce Taylorova kuželu má průměr okolo 1,5  $\mu\text{m}$  a nese kolem 50000 elementárních nábojů. Po roztržení mají kapky průměr okolo 0,1  $\mu\text{m}$  a 300 až 400 elementárních nábojů [29]. S každou další generací kapek se tak násobí náboj, který kapky nesou. Postupně se odpařuje rozpouštědlo a vznikají ionty. K popisu přechodu iontů z kapalné fáze do plynné bylo navrženo několik modelů – model vypaření iontu (ion evaporation model – IEM), model zbytkového náboje (charge residue model – CRM) a model vypuzení řetězce (chain ejection model – CEM). Ionty dále přenášeny pomocí iontové optiky skrze rozhraní do další části přístroje, která obsahuje vakuum a jsou analyzovány [9, 26]



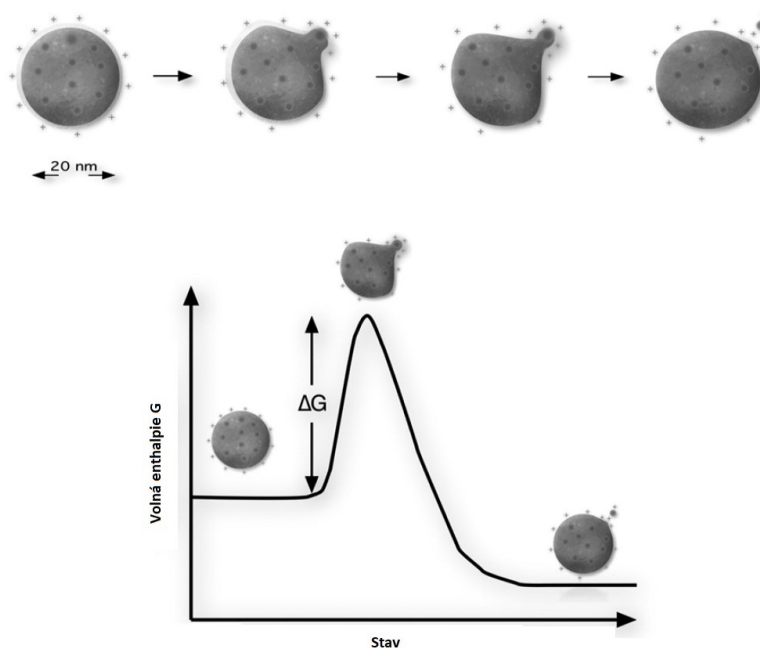
Obrázek 3 – Schématické znázornění ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Převzato a upraveno z [30].

### 2.3.3.1. Model vypaření iontu

Model odpaření iontu (IEM) navrhli Iribarne a Thomson k vysvětlení generování iontů z nabitých kapek, které jsou produkovány elektrosprejem [31, 32]. Kapky se zmenšují díky odpařování rozpouštědla do chvíle, kdy je síla pole kolem jejich povrchu dostatečně velká k vytržení solvatovaných iontů [29, 31–33]. Iribarne a Thomson navrhli s použitím teorie přechodového stavu rovnici (2), která popisuje reakční konstantu emise iontu z nabitě kapky:

$$k_R = \frac{k \cdot T}{h} \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G^*}{R \cdot T}\right)} \quad (2)$$

Kde je  $k_R$  reakční konstanta,  $k$  Boltzmannova konstanta,  $T$  teplota,  $h$  Planckova konstanta,  $\Delta G^*$  volná entalpie a  $R$  plynová konstanta. Obrázek 4 zobrazuje postup vytržení iontu z nabitě kapky a aktivační bariéru, kterou vyjadřuje volná entalpie  $\Delta G^*$  v rovnici (2). Dříve bylo předpokládáno, že aktivační bariéra vzniká protichůdnými silami, které působí na ion opouštějící perfektně sférickou kapku [30]. Ahadi a Konermann [34] pomocí molekulární dynamiky ukázali, že ion je při opouštění kapky podporován můstkem tvořeným molekulami rozpouštědla, který se později rozpadá. Jejich experimenty ukázaly, že v případě vody jako rozpouštědla je povrchové napětí vyšší, kapka si drží sférickou geometrii a nedochází tak k tvorbě můstku a k vypuzení iontu dochází jen vzácně. Naopak u roztoků methanolu nebo směsi methanolu s vodou (50/50) dochází snadněji k deformaci kapky, vytvoření můstku a vypuzení iontu.



Obrázek 4 – Proces vypaření iontu. Ion opouští nabitou kapku v solvatovaném stavu. Převzato a upraveno z [22].

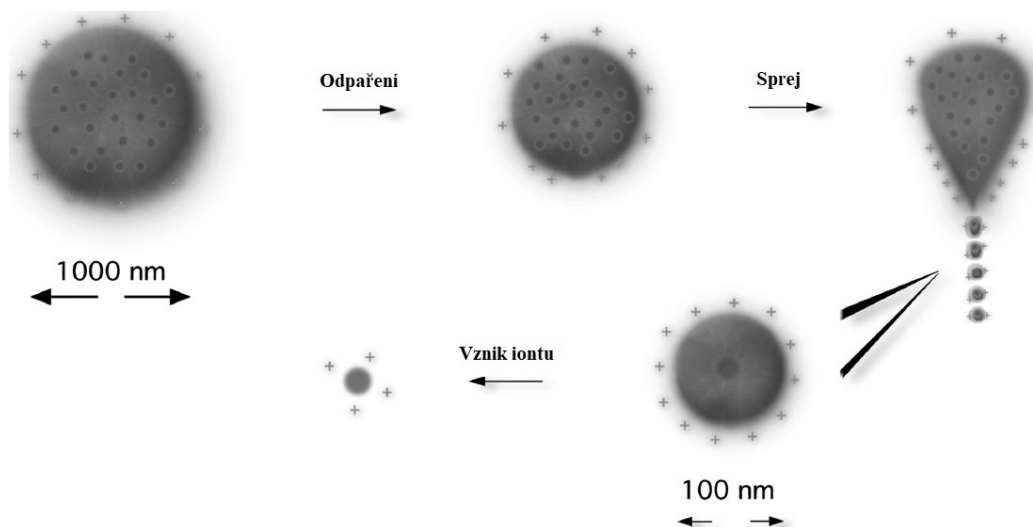
### 2.3.3.2. Model zbytkového náboje

Ionty mohou do plynné fáze převedeny mechanismem, který popisuje model zbytkového náboje (CRM) [24, 28, 35]. Tento mechanismus byl popsán například na ionizaci globulárních proteinů. Model CRM předpokládá, že nanokapka blížící se Rayleighho limitu obsahuje pouze jednu molekulu analytu a odpaří se do sucha [30]. Náboj se pak při odpaření rozpouštědla přesune na molekulu analytu [24, 28]. Kapky se dle CRM po dobu odpařování nachází v blízkosti Rayleighho limitu a musí tak v průběhu ztrácet část náboje. K tomu může docházet pomocí vypuzení protonů a malých iontů dle IEM [36]. Z nabitě kapky se odpařuje rozpouštědlo až dojde k překročení Rayleighho limitu a vznikne Taylorův kužel. Tento postup se opakuje, až kapka obsahuje jen jednu molekulu analytu. Ion pak vzniká odpařením rozpouštědla a přenesením náboje na molekulu v kapce [22]. Vypuzení globulárního proteinu pomocí IEM není kineticky možné [30]. ESI produkuje ionty se složením blízkým  $[M + z_R H^{z_R}]$ , kde  $z_R$  je Rayleighho náboj kapky rozměrem se blížícím proteinu [28, 37–39]. Tento náboj je definován rovnicí (3) [40]:

$$z_R = \frac{8\pi(\epsilon_0 \gamma r_{kapky}^3)^{1/2}}{e} \quad (3)$$

Kde  $\epsilon_0$  je elektrická permitivita okolního prostředí,  $\gamma$  je povrchové napětí,  $e$  je elementární náboj a  $r_{kapky}$  poloměr kapky.

Experimenty potvrdily, že náboj predikovaný pomocí CRM nezáleží na iontové formě v roztoku [28, 30, 37–39]. Grafické znázornění CRM ukazuje obrázek 5.

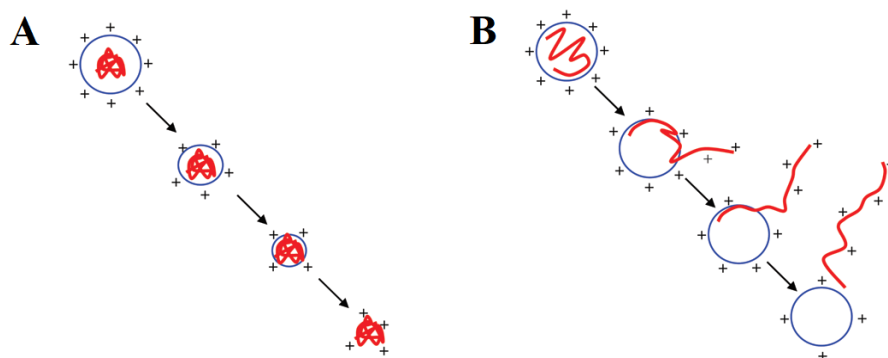


Obrázek 5 – Schéma popisující vznik iontu dle CRM. Převzato a upraveno z [22].

### 2.3.3.3. Model vypuzení řetězce

Molekulární dynamika ukázala, že na rozdíl od globulárních proteinů podléhajících ionizaci dle CRM, rozbalené proteinové řetězce podléhají ionizaci jiným mechanismem [30, 40, 41]. Díky hydrofobnímu charakteru proteinových řetězců není výhodná pozice uvnitř kapky. Rozbalený protein v kapce blížící se Rayleighho limitu migruje na povrch. Jeden konec proteinového řetězce je vypuzen do plynné fáze. Postupně je pak z kapky vypuzen i zbytek proteinu (viz obrázek 6) [30]. Bylo zjištěno, že CEM podstupují polymery neuspořádané, částečně hydrofobní a nesoucí skupiny schopné vázat přebytečný náboj [40, 42].





Obrázek 6 – Porovnání vzniku iontu ze sbaleného (A) a rozbaleného (B) proteinu. Převzato a upraveno z [40].

## 2.4. Derivatizace látek obtížně ionizovatelných v ESI

Citlivost hmotnostní spektrometrie je obecně extrémně vysoká, ale závislá na účinnosti ionizace analytu [43]. Analyty postrádající skupiny schopné protonace nebo deprotonace jsou obtížně ionizovatelné pomocí měkkých ionizačních technik [44]. Látky, které tvoří ionty v roztoku jsou obecně dobře ionizovatelné pomocí ESI. Naopak APCI se více hodí pro ionizaci málo až středně polárních látek obsahujících atomy s vysokou protonovou afinitou [45]. I přesto že je ESI-MS jednou z neúčinnějších analytických metod, její použití pro detekci některých málo polárních komplexů rhenia je omezené. Problémy s ionizací těchto molekul jsou způsobeny absencí kyselých nebo bazických skupin ve struktuře. Pro zvýšení efektivity ionizace lze analyt chemicky modifikovat zavedením skupin schopných protonace nebo deprotonace [43].

Díky derivatizaci mohou vznikat unikátní fragmentové ionty v kolizní cele tandemového hmotnostního spektrometru. Ty pak lze využít k identifikaci a případné kvantifikaci [46]. V posledních letech byla publikována řada používaných derivatizačních technik pro ESI-MS [47–49]. Typ, struktura a hmotnost derivatizačního činidla by měla být zvolena tak, aby vyhovovala pro danou aplikaci. Zatímco derivatizace pomocí malých molekul může být výhodná v případě stericky bráněných skupin, derivatizace velkými molekulami produkuje ionty o vysoké hmotnosti, které jsou v oblasti hmotnostního spektra s menší mírou šumu [46].

Chemická derivatizace analytu je jednou z neúčinnějších metod ke zvýšení citlivosti detekce. Cílem chemické derivatizace je převést obtížně ionizovatelnou nebo neionizovatelnou látku na snadno detekovatelnou změnou jejích chemických a fyzických vlastností.

V analytické chemii je derivatizace především využívána k modifikaci analytu, který nelze analyzovat určitou analytickou metodou nebo ke zlepšení selektivity. Derivatizace může zlepšit separaci a účinnost ionizace [50].

Chemická derivatizace sehrála důležitou roli v analýze pomocí GC-MS. V GC-MS se derivatizace používá ke zvýšení těkavosti, ke změně ionizačních vlastností analytu nebo k ovlivnění fragmentace analytu [51].

Nejpoužívanějšími deriváty v GC-MS jsou methyl, ethyl, acetyl nebo silyl estery mastných kyselin. Většina metod derivatizace probíhá *in situ*, kde příprava vzorku a chemická modifikace probíhají v jednom kroku. Derivatizace v kapalinové chromatografii má odlišné odůvodnění, a proto se uplatňují jiná pravidla při volbě činidla [51].

Obecně platí, že molekula analytu může být protonována, pokud její protonová afinita převyšuje afinitu protonované molekuly rozpouštědla. Na druhé straně k deprotonaci analytu může docházet je-li acidita molekuly analytu v plynné fázi větší než acidita deprotonované molekuly rozpouštědla. K tvorbě záporných iontů může docházet i dalšími procesy jako například tvorbou aduktů nebo záchytem elektronu [52].

Většina derivatizačních technik používaných v ESI se zaměřuje na zavedení trvale nabitě skupiny, nebo skupiny která má vysokou protonovou afinitu či elektronovou afinitu případně se jedná o snadno ionizovatelnou skupinu. U některých obtížně ionizovatelných molekul může ke zlepšení citlivosti detekce přispět tvorba aduktu. V pozitivním módu jsou běžně pozorovány adukty s kovy zejména alkalickými, zatímco v negativním módu se mohou tvořit adukty s karboxyláty a halogenidy [53].

Za tímto účelem se zředěné roztoky různých kovů přidávají přímo do rozpouštědla čímž dochází k efektivnímu zvýšení specifity nebo citlivosti ionizace elektrosprejem. Je například známo, že stříbrné ionty tvoří slabé přenosové komplexy s alkeny. Této vlastnosti bylo využito pro analýzu nenasycených a polyaromatických uhlovodíků [54–58].

Charakteristická vazba mezi stříbrnými ionty a alkeny je založena na interakci obsazeného  $\pi$  orbitalu alkenu s volným orbitalem  $5s$   $Ag^+$  a volného  $\pi^*$  orbitalu alkenu s obsazeným  $4d$  orbitalem  $Ag^+$  [59]. kromě stříbra byla studována možnost využití i některých dalších kovů především  $Cu^+$  a  $Au$  [44, 60].

Derivatizace při ESI-MS analýze byla úspěšně aplikována na řadu malých molekul, neutrálních steroidů a biomolekul, jako jsou například peptidy. Potenciál derivatizace pro ESI-MS v analytické chemii byl prezentován v celé řadě publikací [47–49, 53, 60–65].

Jednou z nevýhod derivatizace je, že mohou být vyžadovány tvrdší reakční podmínky, při kterých dochází k derivatizaci nejen cíleného analytu, ale zároveň dochází k ovlivnění dalších složek vzorku.

Anilin a jeho substituenty patří mezi nejjednodušší slabé báze. Výsledné deriváty obsahují atom dusíku, který je snadno ionizovatelnou skupinou a zlepšuje účinnost ionizace analytů pomocí ESI. Předkládaná diplomová práce se zabývá popisem derivatizační reakce chloroarylkomplexů rhenia pomocí substituovaných anilinů. Předmětem zkoumání byla kinetika reakce, nalezení vhodných derivatizačních činidel, studium fragmentace produktů pomocí hmotnostní spektrometrie a výpočetní chemie. Tento typ reakce již ve své práci úspěšně použila Málková, která studovala derivatizaci pomocí halogenderivátů anilinů [66]. Dále je dalších derivatizačních činidel na bázi anilinu a studiem fragmentace s využitím výpočetních metod.

## 2.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie

Měkké ionizační techniky produkují převážně protonované nebo deprotonované molekuly s nulovou nebo minimální mírou fragmentace ve zdroji. Tím je limitováno množství získaných informací o struktuře ze spektra prvního řádu. Tandemová hmotnostní spektrometrie se proto stala nezbytnou pro strukturní analýzu široké škály látek, jako jsou farmaceutika, peptidy, proteiny, nukleové kyseliny a řada dalších. Při tandemové hmotnostní spektrometrii dochází k aktivaci známého prekurzního iontu a analýze produktů fragmentace [67]. Pomocí prvního analyzátoru je prekurzní ion izolován a následně fragmentován. Fragmentací vznikají iontové fragmenty a neutrální molekuly. Poté jsou vzniklé ionty analyzovány druhým hmotnostním analyzátozem. Produktové ionty mají ve spektru izotopové píky jen v případě, že  $v$  je v prvním kroku vybrán širší pás  $m/z$ , který zahrnuje i izotopové píky prekurzního iontu. Počet fragmentačních kroků je možno v některých případech zvýšit. Tento typ experimentů se obecně nazývá  $MS^n$ , kde  $n$  je počet generací analyzovaných iontů [9].

Jednou z možností tandemového uspořádání je použití hybridního hmotnostního spektrometru (Qq-TOF), který se skládá ze dvou kvadrupólových analyzátorů a jednoho analyzátoru doby letu. První kvadrupólový analyzátor lze použít k selekci iontů o určitém intervalu  $m/z$ . Druhý kvadrupólový analyzátor slouží jako kolizní cela, kde dochází k interakci přicházejících iontů s neutrálními molekulami kolizního plynu. Tento proces se nazývá

kolizně indukovaná disociace (CID z angl. collision-induced dissociation). Analyzátor TOF je pak použit k analýze produktů fragmentace. Tímto typem přístroje lze provádět pouze experimenty MS<sup>2</sup>.

### 2.5.1. Kolizně indukovaná disociace

Technika CID, také známá jako kolizně aktivovaná disociace (CAD) a kolizní aktivace (CA) je jednou z nejpoužívanějších metod aktivace iontů [68–70]. Ionty z iontového zdroje při CID putují do kolizní cely, kde je umístěn kolizní plyn (N<sub>2</sub>, He, Ar) o tlaku výrazně vyšším než okolní vakuum [10]. Kolize prekurzního iontu s molekulami neutrálního plynu způsobuje zvýšení vnitřní energie iontu. Část translační energie atomu se při nepružné srážce převede na vnitřní energii iontu, což vede k následnému rozkladu [71]. Tuto energii lze spočítat dle rovnice (4) [67, 70]:

$$E_{cm} = E_{lab} \frac{M_t}{M_i + M_t} \quad (4)$$

kde  $E_{cm}$  je těžišťová kolizní energie,  $M_i$  je hmotnost iontu;  $M_t$  je hmotnost terče a  $E_{lab}$  je kinetická energie udělená iontu.

Ion dále získanou energii rychle redistribuuje do vibračních hladin. Následuje druhý pomalejší krok, ve kterém dochází k rozpadu excitovaného iontu na produktové ionty a neutrální molekuly. Větší molekuly je pomocí CID obtížnější fragmentovat, protože mají k dispozici větší množství vibračních stavů pro uložení energie a je tak snížena šance, že fragmentace proběhne [72].

Obecně jsou definovány dva typy kolizí v závislosti na energii udělené iontu. V rozmezí kolizní energie 1-100 eV se jedná o nízkoenergetické kolize. V případě energií v řádu keV jde o vysokoenergetické kolize [9, 73].

Hybridní hmotnostní spektrometry zaznamenávají spektra nízkoenergetické CID. Při tandemové hmotnostní spektrometrii v prostoru je kolizní cela kvadrupól v radiofrekvenčním módu, který fokusuje ionty rozptýlené kolizemi. I přes fokusaci dochází k úniku části iontů mimo kolizní celu. Je tak ideální použití hexapólů a oktapólů, které mají vyšší účinnost záchytu než kvadrupóly [9]. Energie iontů v excitovaném stavu je převážně vibračního charakteru [76]. Doba interakce mezi iontem o hmotnosti 200 Da s energií 30 eV s cílem velkým několik Å je okolo 10<sup>-14</sup> s, což odpovídá vibrační periodě vazby.

U přístrojů s ionizací za atmosférického tlaku může docházet (SID – source-induced dissociation) přímo ve zdroji. V přechodové části mohou ionty získat dostatečnou rychlost ke kolizi s molekulami rozpouštědla nebo sušícího plynu. Rychlost iontů může být ovlivněna pomocí napětí na urychlovacích elektrodách. Tento způsob fragmentace je důležitý pro přístroje s jedním hmotnostním analyzátozem [72].

## 2.6. Výpočetní chemie

### 2.6.1. Metody funkcionálu hustoty

Metody funkcionálu hustoty (DFT z angl. density functional theory) patří k *ab initio* („od počátku“) metodám. Řešení časově nezávislé Schrödingerovy rovnice [74] (viz rovnice (5)) je základem metod výpočetní chemie.

$$E\Psi = \hat{H}\Psi \quad (5)$$

kde  $\hat{H}$  je operátor Hamiltonovy funkce (tzv. Hamiltonián),  $\Psi$  vlnová funkce daného objektu a  $E$  jeho energie. Vlnová funkce vychází ze struktury molekuly. Hamiltonián popisuje síly mezi elektrony a jádry a nese informaci o geometrii. Druhá mocnina vlnové funkce ( $\Psi^2$ ) vyjadřuje hustotu pravděpodobnosti výskytu elektronu v daném místě [75, 76].

Jako základní vstupní údaj se ve výpočetní chemii používá atomový orbital, jenž je jednoelektronovou funkcí. Pomocí atomových orbitalů (AO) lze pak popisovat molekulové orbitály (MO). Teorie MO-LCAO (z angl. Molecular Orbital – Linear Combination of Atomic Orbitals) popisuje vznik MO jako lineární kombinaci AO. Slater [77] navrhl funkce k popisu atomových orbitalů (STO z angl. Slater type orbitals) na základě kvantových čísel a efektivního náboje. Výpočty pomocí STO orbitalů jsou ale příliš složité a v některých případech analyticky neřešitelné. Slaterovy atomové orbitály jsou proto aproximovány kombinací Gaussových orbitalů. Soubor funkcí, které lineární kombinací tvoří atomový orbital se nazývá báze. Minimální bázi tvoří sada funkcí, které jsou třeba k vyjádření umístění všech elektronů v atomech molekuly. Zpřesnění výpočtu lze dosáhnout použitím více funkcí k popisu jednoho orbitalu. Takové báze jsou pak označovány *double zeta*, kde je orbital tvořen dvěma funkcemi nebo *triple zeta* pro orbital tvořený třemi funkcemi. Často je při výpočtech využito kombinace obou přístupů. Na valenční elektrony jsou pak použity dvě funkce a na vnitřní pouze jedna, jelikož mají na chemické vlastnosti menší vliv. K popisu deformace orbitalů vlivem přitažlivých sil atomů se zavádí polarizační funkce [75, 78].

Výhoda DFT metod je relativně nízká výpočetní náročnost [79]. DFT je založena na vztahu mezi energií základního stavu a elektronové hustoty, která je funkcí pouze tří proměnných. Hybridní funkcionály jsou nejrozšířenějšími ve výpočetní chemii. Jsou založeny na výpočtu Hartree-Fockovy limity a korelační energii Coulombické repulze elektronů.

Hartreeho-Fockova metoda (HF) řeší neempiricky Schrödingerovu rovnici se zanedbáním Coulombické repulze. Metoda HF je variační, což znamená, že vypočítané aproximativní energie musí být vyšší nebo rovny energii exaktní. Pomocí HF nelze počítat energii systému s více elektrony. Zavádí tak jednoelektronovou funkci. Korelační energie v DFT je pak počítána pomocí funkcionálu hustoty [80].

Hybridní funkcionál použitý v této práci je B3LYP [81, 82]. Je tvořen dvěma funkcionály – Beckeho tříparametrovým [83] a Lee-Yang-Parr funkcionálem [84].

### 2.6.2. Studium fragmentace využitím výpočetních metod

Fragmentace v tandemovém hmotnostním spektrometru je komplexní proces. Stabilita iontu, vnitřní energie iontu a jeho struktura jsou jedny z hlavních parametrů, na kterých průběh fragmentace závisí [9, 69, 85, 86]. Existují programy, které se snaží predikovat vzniklé fragmenty: Mass Frontier (ThermoFinnigan, San Jose, USA), ACD/MS Fragmenter (Advanced Chemical Development, Toronto, Canada) a další. Tyto programy vychází z pravidel založených na fragmentaci v EI, která nemusí platit pro ionty vzniklé pomocí API, nebo z dat získaných z MS/MS databází [87, 88]. Vygenerovaný seznam předpokládaných fragmentů tak vzniká štěpením všech vazeb ve zkoumané molekule, který lze porovnat s naměřeným spektrem. Tento přístup však nebere v potaz termodynamická data, ani vliv protonace/deprotonace na MO a strukturu molekuly [86]. Dochází tak k predikci velkého množství fragmentů, z jen část reálně vzniká. Pravidla fragmentace pomocí CID nebyla dosud popsána ve stejném rozsahu, jako pro EI. Fragmentace v EI byla popsána na základě velkého množství dat shromážděných v knihovnách spekter. Pro CID neexistují rozsáhlé knihovny spekter a standardní podmínky pro jejich měření a není tak možný stejný přístup jako v EI [89].

Rasche a kol. [90] navrhli způsob predikce fragmentace protonovaných organických molekul na základě fragmentačních stromů. Navržené fragmentační stromy obsahují hmoty, molekulové vzorce a závislosti mezi fragmenty. Umožňují tak určení struktury neznámé látky. Jednou z výhod této metody je možnost zapojení do plně automatizovaného procesu analýzy.

Jednu z možností predikce fragmentace ukázali například Bandu a kol. [91], kteří se zaměřili na CID karboxylových kyselin. Definovali pravidla popisující, ve kterých případech dochází k neutrální ztrátě 44 Da odpovídající CO<sub>2</sub> a kdy k tomuto jevu nedochází. Dokázali tak správně odhadnout odštěpení CO<sub>2</sub> u 18 z 20 farmaceutik obsahujících karboxylovou skupinu. Klagkou a kol. [92, 93] studovali fragmentaci sulfonamidů a na základě znalosti fragmentačních mechanismů dokázali předpovědět vzniklé fragmenty.

V minulosti byla výpočetní chemie využívána pro výpočty energií iontů, intermediátů a popisu možných cest fragmentace. Metodu DFT lze použít pro výpočty optimalizované struktury. Lze také sledovat změnu elektronové hustoty v molekule při protonaci/deprotonaci a oslabení nebo zesílení vazby při procesu ionizace [94]. Místo protonace/deprotonace má zásadní vliv na fragmentaci molekuly a lze ho částečně odhadnout na základě výpočtu protonové afinity [86].

K výpočtům s cílem predikce fragmentace lze využít semiempirické i *ab initio* výpočetní metody. Například Wright a kol. [86, 89, 95–98] v řadě publikací ukázali, že pomocí metod Austin Model 1 (AM1) a DFT lze předpovědět místo protonace a následné prodloužení nebo zkrácení vazeb. Z jejich výsledků je patrné, že při prodloužení vazby během ionizace dochází ve většině případů k jejímu štěpení během CID. Výsledky získané metodami AM1 a DFT se výrazně nelišily. Dále zjistili, že štěpení nepolarizované vazby uhlík-uhlík nelze pomocí prodloužení vazby předpovědět. V CID však ve většině případů dochází ke štěpení vazby obsahující heteroatom [97]. V souboru 16 molekul dokázali úspěšně predikovat všechny reálně štěpené vazby. Pouze 36 % predikovaných štěpení vazeb nebylo při praktickém měření ve spektru nalezeno.



### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité chemikálie

Tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenát [(n-Bu<sub>4</sub>-N)(ReOCl<sub>4</sub>)] (98%), 4-chloroanilin, 4-bromoanilin, 4-metylanilin, 4-isopropylanilin, anilin, 4-methylcatechol a 1,2-dihydroxybenzen byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Acetonitril (HPLC grade) a trimethylamin byly zakoupeny od firmy Fisher Scientific.

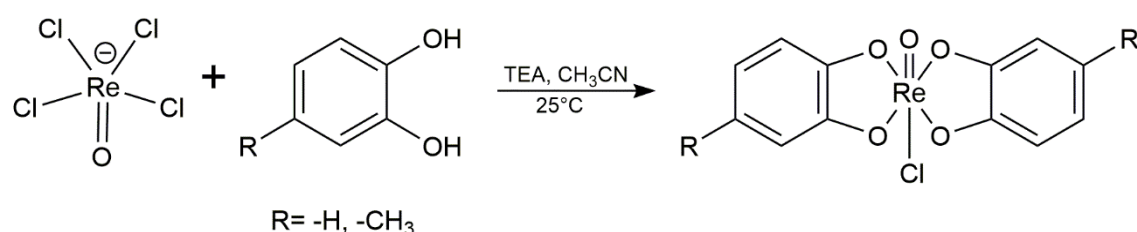
Dusík byl vyroben generátorem dusíku MS-NGM 11 (Bruker Daltonics, Německo).

#### 3.2. Přístroje a programy

Přístroj Bruker QqTOF compact ovládaný pomocí programu Compass otofControl 4.0 (Bruker Daltonics, Německo) byl použit pro ESI-MS experimenty. Vyhodnocení hmotnostních spekter bylo provedeno v programu Compass DataAnalysis 4.4 (Bruker Daltonics, Německo). Struktury molekul a fragmentační schémata byla vytvořena v programu ChemDraw (PerkinElmer Informatics, USA). Izotopové profily a přesné hmoty iontů byly spočítány pomocí utility IsotopePattern 3.0 (Bruker Daltonics, Německo). Analytické váhy Kern ALJ 220-4 (Kern & Sohn, Německo) byly použity pro vážení pevných látek. K míchání bylo použito míchadlo Stuard SA8 (Cole Parmer, UK). UV/Vis spektra byla měřena na přístroji Agilent 8453.

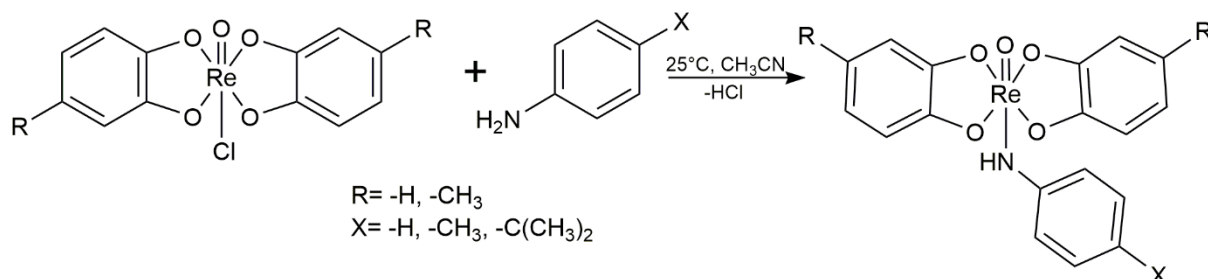
#### 3.3. Příprava komplexů a derivatizace

Chlorokomplexy [Re(O)Cl(Cat)<sub>2</sub>] a [Re(O)Cl(DHT)<sub>2</sub>] byly připraveny dle postupu adaptovaného z literatury [7]. Schéma reakce je zobrazeno na obrázku 7. V 1,5 ml acetonitrilu bylo rozpuštěno 4,4 mg (7,5 μmol) tetrabutylammonium tetrachlorooxorhenátu [(n-Bu<sub>4</sub>-N)(ReOCl<sub>4</sub>)]. Dále bylo přidáno 1,7 mg (15 μmol) katecholu nebo 1,9 (15 μmol) DHT podle typu připravovaného komplexu. Nakonec bylo přidáno 20 μl 10 % (v/v) roztoku triethylaminu v acetonitrilu. Reakční směs byla míchána po 3 dny za laboratorní teploty.



Obrázek 7 – Schéma přípravy komplexů.

Reakční schéma derivatizační reakce je zobrazeno na obrázku 8. K 10  $\mu\text{l}$  roztoku chlorokomplexu  $[\text{Re}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$  nebo  $[\text{Re}(\text{O})\text{Cl}(\text{DHT})_2]$  o koncentraci 5 mmol/l bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku p-substituovaného anilinu o koncentraci 25 mmol/l.



Obrázek 8 – Schéma derivatizační reakce.

### 3.1. Kinetická měření

Měření kinetiky derivatizační reakce pomocí ESI-MS bylo prováděno smícháním reaktantů v koncentrované formě. Ředění v poměru 1:100 bylo prováděno těsně před zmlžovačem. Hmotnostní spektrum bylo kontinuálně zaznamenáváno po dobu 60 min.

Pro UV/Vis kinetická měření byl roztok zředěn v poměru 1:4 acetonitrilem do 2ml uzavíratelné křemenné kyvety s délkou optické dráhy 1 cm. Spektra byla zaznamenána v rozsahu 250–800 nm s krokem 1 nm.

### 3.2. Výpočty DFT

Výpočty DFT byly prováděny pomocí programu Gaussian 16 [99] hybridním funkcionálem B3LYP [83, 84] s bází LanL2DZ [100–102].

Struktury ionizované a nenabitě formy studovaných komplexů byly optimalizovány.

### 3.3. Podmínky měření

Měření ESI-MS probíhalo v negativním módu v rozsahu  $m/z$  50–1000. Teplota sušícího plynu ( $\text{N}_2$ ) byla 220  $^\circ\text{C}$  při průtoku 3,0 l/min. Napětí kapiláry bylo 3500 V. Vzorky byly vstříkovány do zmlžovače pístovou pumpou (Cole Parmer, USA) při průtoku 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Šířka izolovaného pásu byla při CID experimentech 5 Da a tlak kolizního plynu v kolizní cele  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mbar. Měření probíhalo v rozsahu od 10 eV do 200 eV laboratorní kolizní energie  $CE$  s krokem 1 eV.

## 4. Výsledky a diskuse

Použitou metodou derivatizace pomocí para substituovaného anilínu byla do struktury studovaných komplexů vnesena funkční skupina umožňující po deprotonaci vznik záporně nabitých iontů.

### 4.1. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

Produkty derivatizační reakce uvedené na obrázku 8 byly charakterizovány pomocí měření hmotnostních spekter. U všech molekulárních iontů připravených derivátů byl pozorován charakteristický izotopový profil. Naměřená HRMS data připravených komplexů a jejich srovnání s vypočítanými hodnotami přehledně zobrazuje tabulka 1. Chyby odráží rozdíl mezi teoretickou a naměřenou hmotou. Index podobnosti (*SI*) vyjadřuje shodu teoretického a experimentálně naměřeného izotopového profilu. U všech připravených komplexů bylo dosaženo shody převyšující 89 %. Rovněž chyba při měření přesných hmot byla ve všech případech menší než 2 ppm. Z výsledků je patrná výrazná shoda mezi naměřenými a teoretickými hodnotami což také potvrzuje správnost přiřazení elementárního složení k dané hmotě.

Tabulka 1 – Teoretické a experimentálně získané hmoty aniontů studovaných derivátů.

Označení	Sumární vzorec	Teoretická <i>m/z</i>	Měřená <i>m/z</i>	Chyba [mDa]	Chyba [ppm]	(1- <i>SI</i> )100 [%]
[Re(O)(Cat) <sub>2</sub> An] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub> Re	510,0357	510,0360	-0,3	-0,6	98,1
[Re(O)(Cat) <sub>2</sub> PT] <sup>-</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>5</sub> Re	524,0514	524,0507	0,7	1,2	89,2
[Re(O)(Cat) <sub>2</sub> PIPA] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> Re	552,0827	552,0828	-0,2	-0,3	98,1
[Re(O)(DHT) <sub>2</sub> An] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub> Re	538,0670	538,0676	-0,6	-1,1	92,3
[Re(O)(DHT) <sub>2</sub> PT] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> Re	552,0827	552,0824	0,3	0,5	99,3
[Re(O)(DHT) <sub>2</sub> PIPA] <sup>-</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>5</sub> Re	580,1140	580,1142	-0,2	-0,4	91,5

$$SI = \frac{\sqrt{\sum_i \left( \frac{i - i_0}{i_0} \cdot 100 \right)^2}}{N} \quad (6)$$

Hodnoty  $SI$  byly vypočítány ze vztahu (6), kde  $(i - i_0)$  vyjadřuje rozdíl v intenzitách signálů dvou sloučenin s danou hmotou a  $i_0$  je menší z nich a  $N$  je počet fragmentových iontů použitých k porovnání.

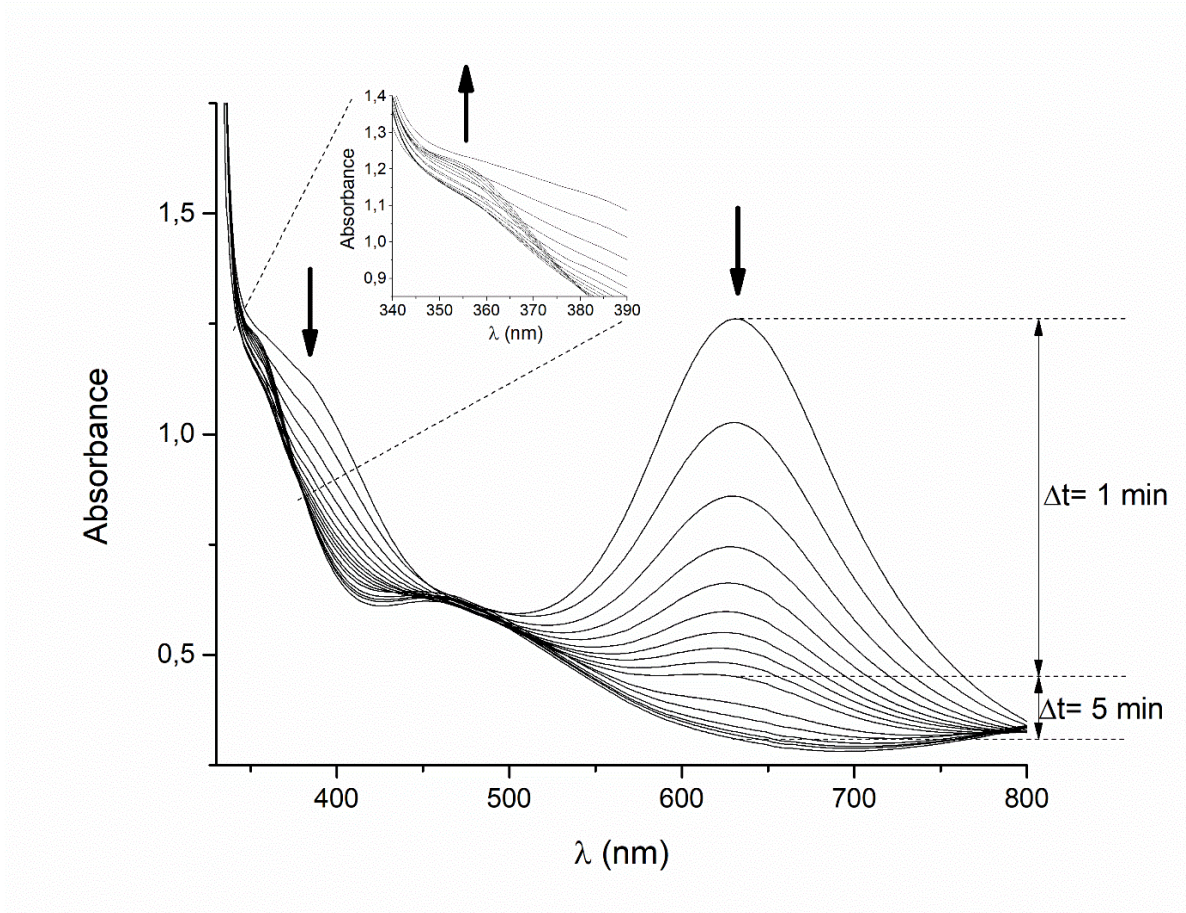
Vzhledem k tomu, že byla pozorována výrazná analogie v chování všech připravených derivátů, byl komplex  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  zvolen jako zástupce, na kterém budou prezentovány výsledky dalších experimentů. Získaná data ostatních derivátů jsou dostupná ve formě přílohy.

## 4.2. Reakční kinetika

Pro podrobný popis reakce a jejího časového průběhu byla provedena kinetická měření pomocí hmotnostní spektrometrie a UV/Vis spektrometrie. Kinetická měření byla prováděna v návaznosti na experimenty N. Málkové [66] a jako derivatizační činidlo byl použit *p*-bromanilin.

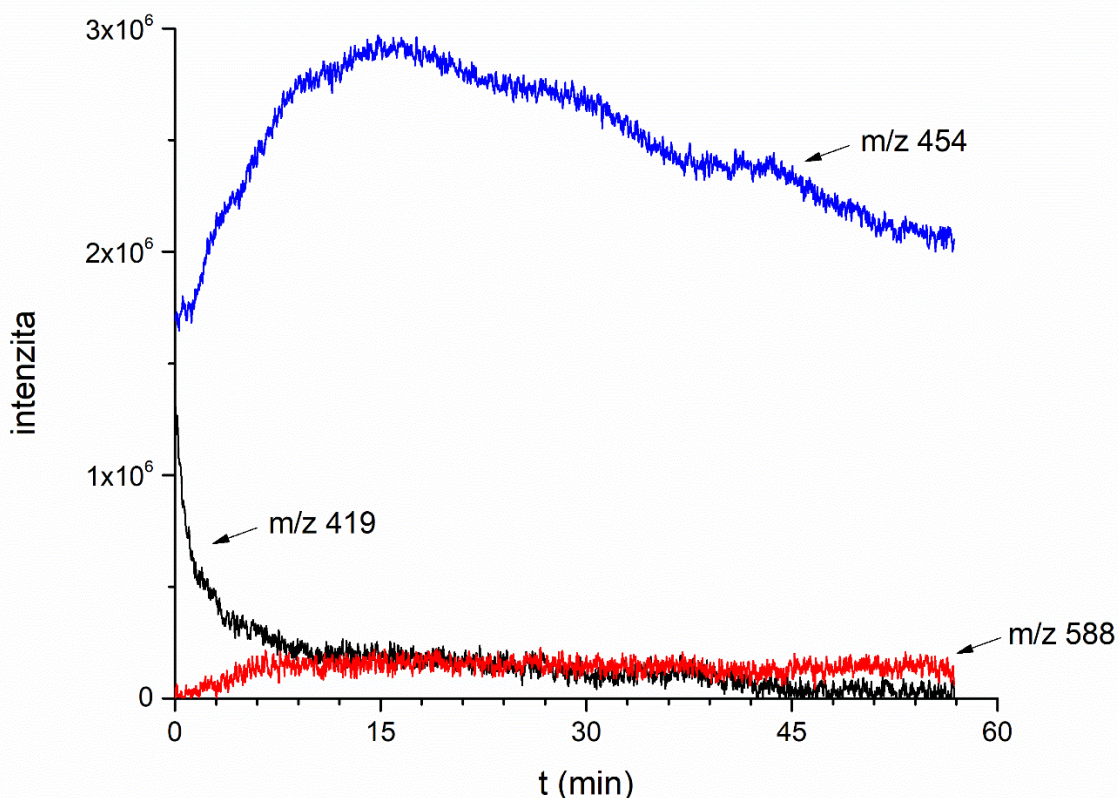
Změna UV/Vis absorpčního spektra v čase během derivatizační reakce  $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$  s PBrA je zobrazena na obrázku 9.

Výrazný absorpční pás při  $\lambda_{\text{max}}=630$  nm a slabší pás při  $\lambda_{\text{max}}=390$  nm odpovídají intenzivní modrozelené barvě komplexu  $[\text{Re}^{\text{VII}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$ . Produkt derivatizační reakce s *p*-substituovaným anilinem je slabě žlutý s absorpčním maximem při  $\lambda_{\text{max}}=355$  nm. Časové intervaly mezi měřeními jsou zobrazeny v grafu. Během prvních 15 minut měření došlo k 90% poklesu absorpčního pásů při  $\lambda_{\text{max}}=630$  nm a  $\lambda_{\text{max}}=390$  nm. V dalších 45 minutách obě absorpční maxima zanikají a postupně vzrůstá intenzita absorpčního pásu při  $\lambda_{\text{max}}=355$  nm (viz přiblížená část grafu).



Obrázek 9 – Spektra absorpce v UV/Vis oblasti zaznamenána během 45 min. Časové intervaly mezi jednotlivými měřeními jsou zaznamenány v grafu. Tučné šipky ukazují na pokles/nárůst absorpčního maxima v čase.





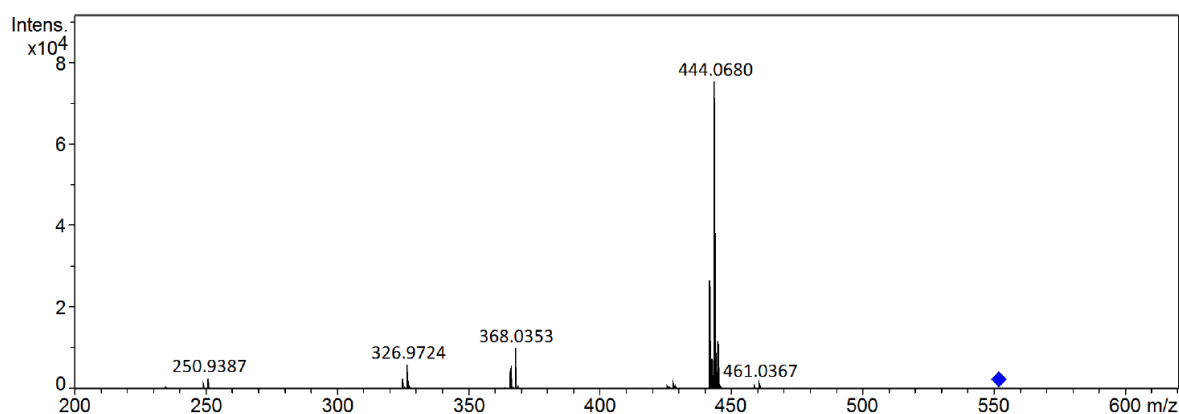
Obrázek 10 – Graf časového vývoje intenzity vybraných iontů v ESI-MS při reakci  $[\text{Re}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$  s p-bromoanilinem v prostředí 2 ekvivalentů TEA.

Průběh stejné reakce byl sledován pomocí ESI-MS. Časový vývoj intenzit sledovaných iontů zobrazuje obrázek 10. Intenzita iontu  $m/z$  588, který je produktem derivatizační reakce, nabývá maxima zhruba po 15 minutách, což odpovídá pozorovanému poklesu absorpčního pásu  $[\text{Re}^{\text{VII}}\text{OCl}(\text{Cat})_2]$  při  $\lambda_{\text{max}}=630$  nm. Vznik iontu  $m/z$  454 ukazuje, že derivát anilinu jako slabá báze urychluje oxidaci komplexu obsahujícího  $\text{Re}^{\text{V}}$  na formu  $\text{Re}^{\text{VI}}$ . Komplexy obsahující  $\text{Re}^{\text{VI}}$  jsou náchylné k oxidaci a po dosažení maxima v 15 minutě tak intenzita iontu  $m/z$  454 postupně klesá.

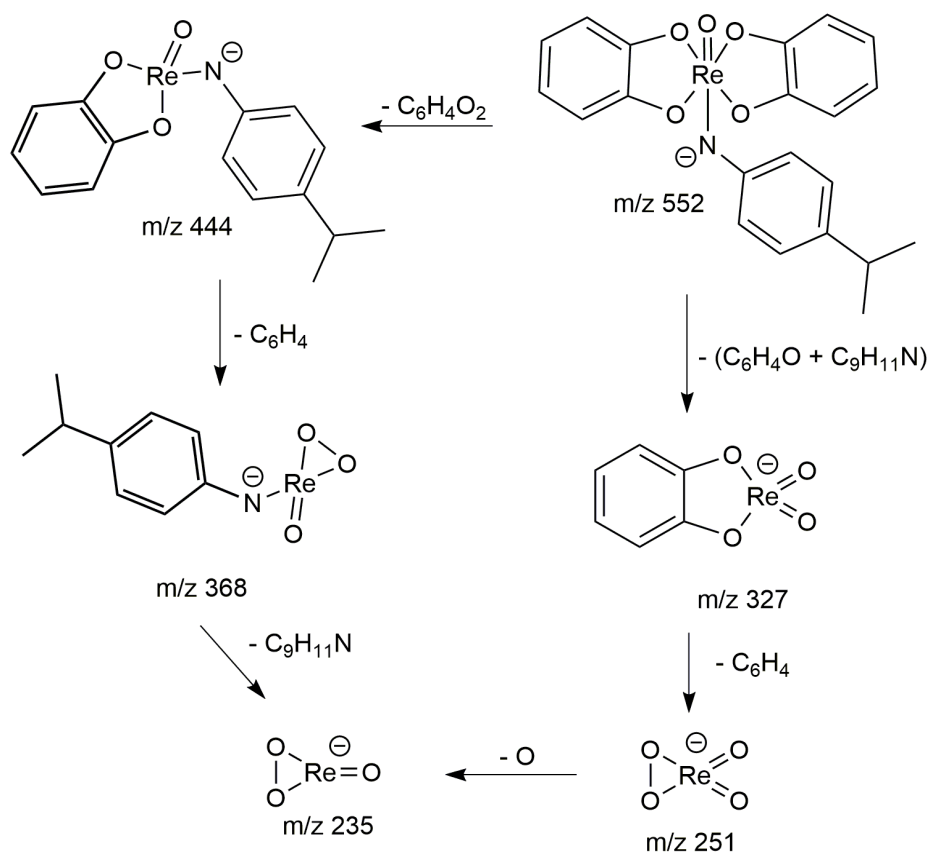
Časový průběh intenzit sledovaných iontů také pomohl při určení skutečné struktury iontu  $m/z$  454. V tomto případě by nebylo možné ani s pomocí HRMS rozhodnout, jestli se jedná komplex s vázaným atomem chloru  $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]^-$  a nebo jestli tento iont vzniká jako adukt s chlorem  $[\text{Re}^{\text{VI}}(\text{O})(\text{Cat})_2]^{\text{Cl}^-}$ , neboť by se shodovaly jejich hmotnosti. Uvedená časová závislost iontových intenzit na obrázku 10 však přítomnost aduktu chloru prakticky vylučuje.

### 4.3. Kolizně indukovaná disociace

Struktura připravených derivátů byla určena sledováním vybraných reakcí (MRM) v negativním módu při kolizní energii 35 eV. Spektrum připraveného komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  při 35 eV je zobrazeno na obrázku 11. Spektra MS/MS ostatních komplexů jsou uvedena v příloze B. Základní pík při  $m/z$  444 vzniká odstoupením katecholu z iontu prekurzoru, který je označen modrou značkou. Izotopový profil molekulárního iontu je zachován i v případě iontu  $m/z$  444 a potvrzuje přítomnost izotopů rhenia. Ve spektru je dále pozorován ion  $m/z$  368, který vzniká ztrátou aromatického kruhu z druhého katecholového ligandu. Průběh fragmentace tak naznačuje přítomnost velmi silné vazby Re-N. Druhou cestou fragmentace molekulového iontu  $m/z$  552 je ztráta substituovaného anilinu a vznik iontu  $m/z$  327. Celý proces fragmentace pak končí vznikem  $\text{ReO}_4^-$  a následně  $\text{ReO}_3^-$ . Navržené fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  je zobrazeno na obrázku 12. Fragmentační spektra ostatních komplexů jsou uvedena v příloze C.



Obrázek 11 – MS/MS spektrum derivátu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  při kolizní energii 40 eV.



Obrázek 12 – Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]^-$ .

Naměřené hmoty iontů získaných fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]^-$  při kolizní energii 35 eV a jejich relativní intenzity jsou zobrazeny v tabulce 2. Dále jsou doplněny teoretické hmoty a vypočítané chyby měření.

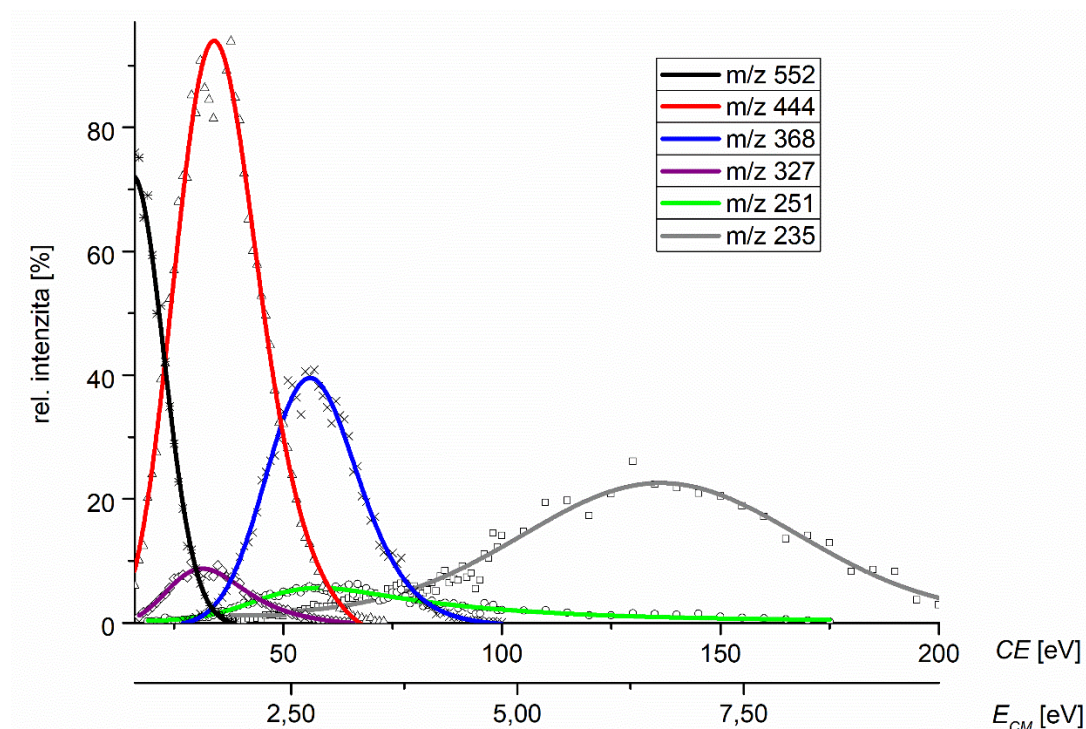
Tabulka 2 – Teoretické a experimentálně získané hmoty fragmentů  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]^-$  při kolizní energii 35 eV. Chyby vyjadřují rozdíl mezi teoretickou a naměřenou hmotou.

Nominální $m/z$	Sumární vzorec	Teoretická $m/z$	Měřená $m/z$	Chyba [ppm]	Chyba [mDa]	Relativní zastoupení
552	$\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Re}^-$	552,0826	552,0882	-10,1	-5,6	0,1%
444	$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Re}^-$	444,0615	444,0680	-14,6	-6,5	100,0%
368	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{Re}^-$	368,0302	368,0353	-13,9	-5,1	13,2%
327	$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_4\text{Re}^-$	326,9673	326,9724	-15,6	-5,1	7,9%
251	$\text{ReO}_4^-$	250,9360	250,9387	-10,8	-2,7	3,5%
235	$\text{ReO}_3^-$	234,9410	234,9441	-13,2	-3,1	0,5%

U všech připravených komplexů byla zkoumána závislost relativní intenzity fragmentových iontů na kolizní energii. Laboratorní kolizní energie byla přepočítána na



těžišťovou kolizní energii podle rovnice 4. Tato závislost pro komplex s  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]^-$  je zobrazena na obrázku 13. Podobné experimenty byly provedeny i s ostatními připravenými deriváty a výsledky jsou uvedeny v příloze A. Křivky byly vytvořeny proložením experimentálně získaných bodů pomocí funkcí Gaussovského typu v programu Origin Pro 9.0 (OriginLab Corporation, USA).



Obrázek 13 – Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]^-$  na kolizní energii, resp. těžišťové kolizní energii.

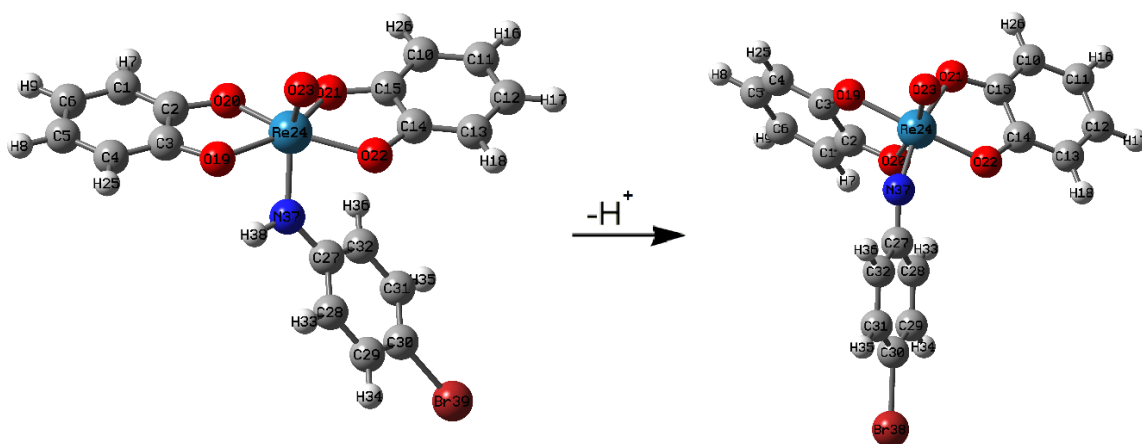
Diagram CID na obrázku 13 popisuje průběh fragmentace komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]^-$ . Prekurzním iontem je ion  $m/z$  552. Z něj při zvýšení kolizní energie vznikají ionty  $m/z$  444 a  $m/z$  327. Maximální intenzity nabývají tyto ionty při kolizní energii zhruba 33 eV. Ion  $m/z$  444 vzniká odštěpením jednoho z ligandů, zatímco v případě ionu  $m/z$  327 odstupuje současně *p*-substituovaný anilín. Tento krok má ale daleko nižší prioritu, což je vyjádřeno výrazně nižší zhruba 13 % relativní intenzitou vznikajícího fragmentu. Ion  $m/z$  327 ztrátou benzenového jádra přechází na ion  $[\text{Re}^{\text{V}}\text{O}]_4^-$   $m/z$  251, ve kterém by mělo rhenium vystupovat v oxidačním stavu V. Z charakteru této závislosti vyjádřené zelenou křivkou bez výrazných maxim lze dále usuzovat na přítomnost izobarického iontu s rheniem v oxidačním stavu VII vznikajícího již při nejnižších kolizních energiích rozpadem prekurzního iontu vlivem vnějších podmínek, jako je například vlhkost. Z iontu  $m/z$  444 odstupuje část druhého ligandu za vzniku iontu  $m/z$

368, jehož intenzita nabývá maxima při stejné kolizní energii jako intenzita iontu  $m/z$  251. Celý proces fragmentace pak končí vznikem iontu  $m/z$  235. Vysoká energie, při které dochází k odštěpení derivatizačního činidla z iontu  $m/z$  368 za vzniku iontu  $m/z$  235 demonstruje sílu vazby Re-N. Na základě takto získaných informací bylo možné navrhnout fragmentační schéma, které je uvedeno na obrázku 12. U všech dalších připravených komplexů bylo pozorováno analogické fragmentační chování a příslušné návrhy fragmentačních schémat jsou uvedeny v příloze C.

## 4.4. Výpočty DFT

### 4.4.1. Optimalizace struktury

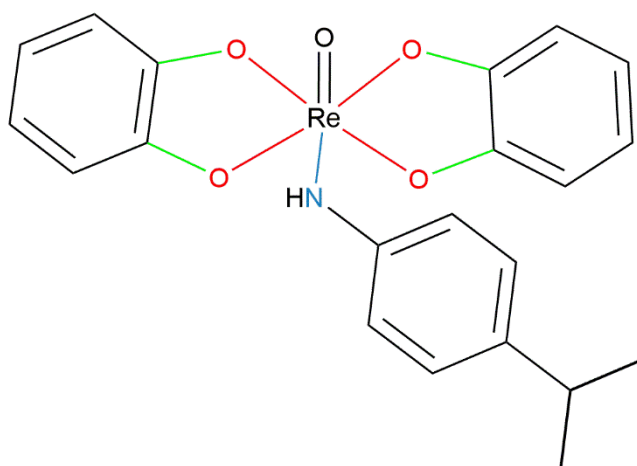
Struktury elektroneutrální a ionizované formy komplexů byly optimalizovány pomocí hybridního funkcionálu B3LYP a bázi LanL2DZ. Na obrázku 14 je zobrazen proces deprotonace molekuly  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PBrA}]$  v plynné fázi na  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PBrA}]^-$ .



Obrázek 14 – Změna struktury  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PBrA}]$  během ionizace. Struktury neionizované i ionizované formy komplexu byly optimalizovány pomocí DFT.

#### 4.4.2. Změna délky vazby

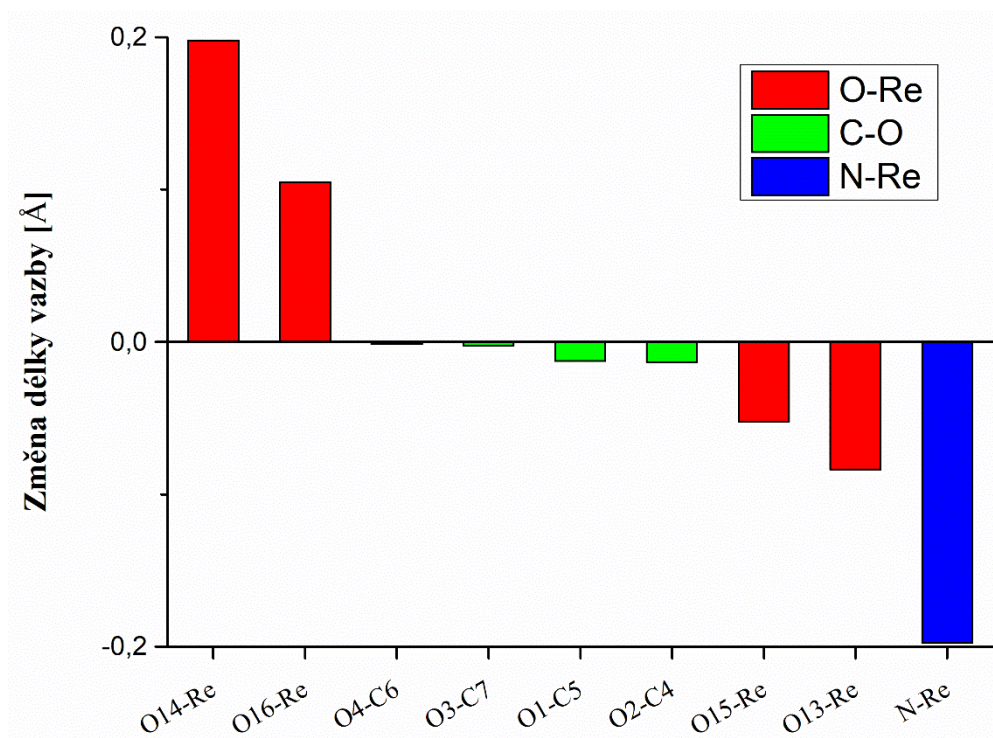
Byla studována změna délky vybraných vazeb v molekulách komplexů mezi ionizovanou a neionizovanou formou. Struktura komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  s barevně označenými vazbami, jejichž délka byla v rámci molekul studována, je ukázána na obrázku 15. Vazby C-C a C-H studovány nebyly, protože štěpení tohoto typu vazby je při ESI ionizaci nepravděpodobné [9, 92].



Obrázek 15 – Barevné vyznačení vazeb v komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$ , u kterých byla sledována změna délky během ionizace. Zelená pro vazby C-O, červená pro vazby Re-O a modrá pro vazbu N-Re.

Výsledky změny délky vazeb u komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  jsou graficky zpracovány na obrázku 16. Označení atomů u komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$  je analogické k číslování atomů komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PBrA}]$  na obrázku 14. K výraznému prodloužení došlo v případě dvou protilehlých vazeb Re-O20 a Re-O21. U délky vazeb C-O došlo k nejmenší změně. U vazeb Re-O19 a Re-O22 došlo k mírnému zkrácení. Vazba N-Re se vlivem ionizace zásadně zkrátila. Prodloužení vazby Re-O14 naznačuje, že během ionizace dochází k jejímu oslabení. Z CID diagramu tohoto komplexu na obrázku 13 je patrné, že intenzita iontu  $m/z$  444, který vzniká odstoupením ligandu, nabývá maxima již kolem kolizní energie 33 eV. Zároveň je ion  $m/z$  444 nejintenzivnějším fragmentem v MS/MS spektru. Naopak ion  $m/z$  327 vznikající odstoupením jednoho ligandu a derivatizačního činidla nabývá výrazně nižší intenzity než ion  $m/z$  444. Tomu odpovídá i fakt, že během ionizace dochází ke zkrácení vazby Re-N a její štěpení je tedy méně pravděpodobné než samotné odstoupení ligandu. Při kolizní energii cca 56 eV nabývá maxima ion  $m/z$  368, který vzniká odštěpením části zbylého

katecholového ligandu. Maximální intenzita iontu  $m/z$  368 je nižší než v případě iontu  $m/z$  444 a poloha maxima i nižší intenzita tak koresponduje s vypočtenou změnou délky vazby. K odštěpení derivatizačního činidla z iontu  $m/z$  368 dochází při nejvyšší kolizní energii a výsledek je tak ve shodě s vypočítaným zkrácením vazby Re-N.

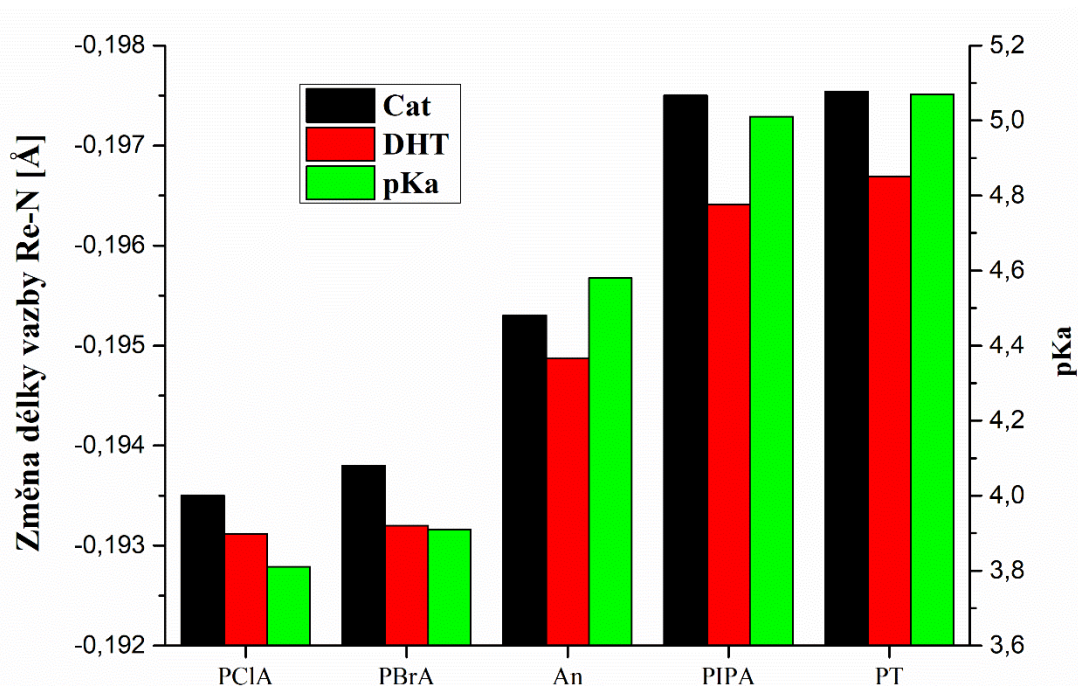


Obrázek 16 – Graf změny délky konkrétních vazeb typu O-Re, C-O a N-Re mezi ionizovanou a neionizovanou formou komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$ .

U všech připravených komplexů dochází k obdobnému prodloužení nebo zkrácení daného typu vazby jako u  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PIPA}]$ . Typ derivatizačního činidla má vliv pouze na délku vazby Re-N (viz obrázek 17).

Výpočty ukázaly, že typ substituentu v poloze para má vliv na zkrácení vazby Re-N během ionizace. Při použití halogenovaného derivatizačního činidla bylo výsledné zkrácení délky vazby po ionizaci menší než v případě anilinů s vyšší bazicitou. Všechny komplexy s katecholem vykazovaly větší zkrácení vazby než komplexy s 2,3-dihydroxytoluenem.





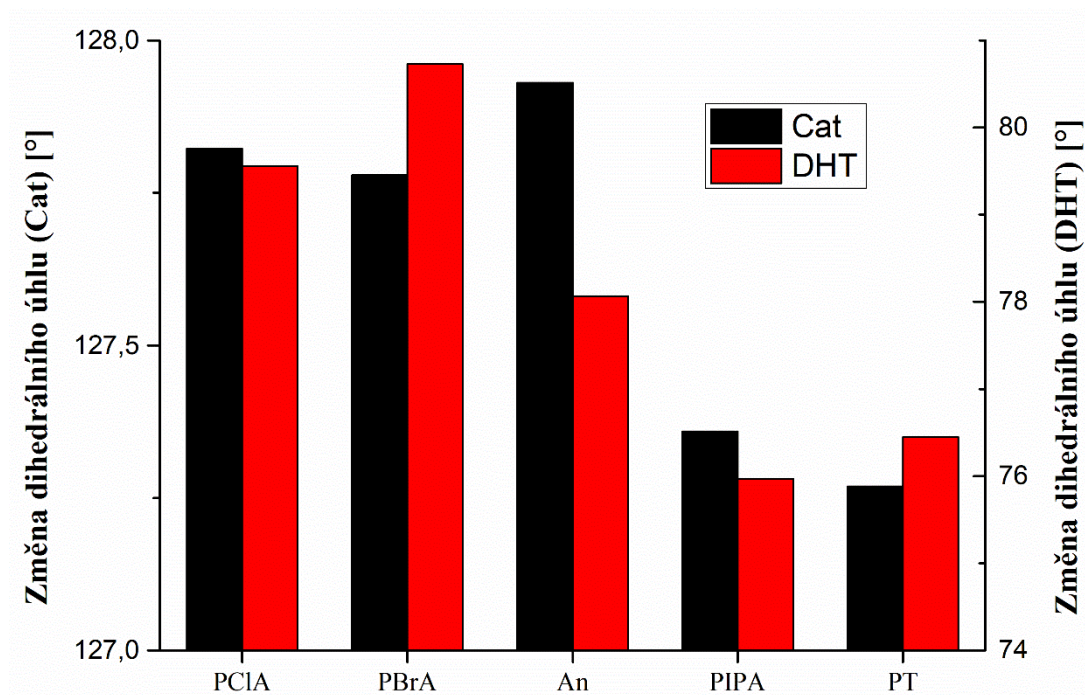
Obrázek 17 – Grafická závislost změny délky vazby Re-N mezi ionizovanou a neionizovanou formou komplexů s katecholem a 2,3-dihydroxytoluenem v závislosti na použitém derivatizačním činidle. Zelené sloupce zobrazují hodnoty pKa příslušných anilinů.

Na obrázku 17 je porovnání vlivu bazicity substituentu na změnu délky vazby Re-N. Z tohoto grafu je patrné, že se vzrůstající hodnotou pKa substituentu roste i změna délky vazby Re-N. Vliv substituentu se také odráží ve fragmentačním chování komplexů, což je zřejmé z CID diagramů. Data byla dále porovnána s výsledky z předchozího výzkumu [66]. Zatímco u derivátu s PBrA fragment  $m/z$  404 vznikající postupnou ztrátou obou ligandů nabývá maximální intenzity při  $E_{CM}$  1,37 eV, v případě fragmentace komplexu s PT leží maximum obdobného fragmentu  $m/z$  340 až při  $E_{CM}$  2,46 eV. V případě komplexu s PT je vazba v ionizované formě komplexu výrazně pevnější a je tedy potřeba větší množství energie k jejímu štěpení.

#### 4.4.1. Změna dihedrálního úhlu

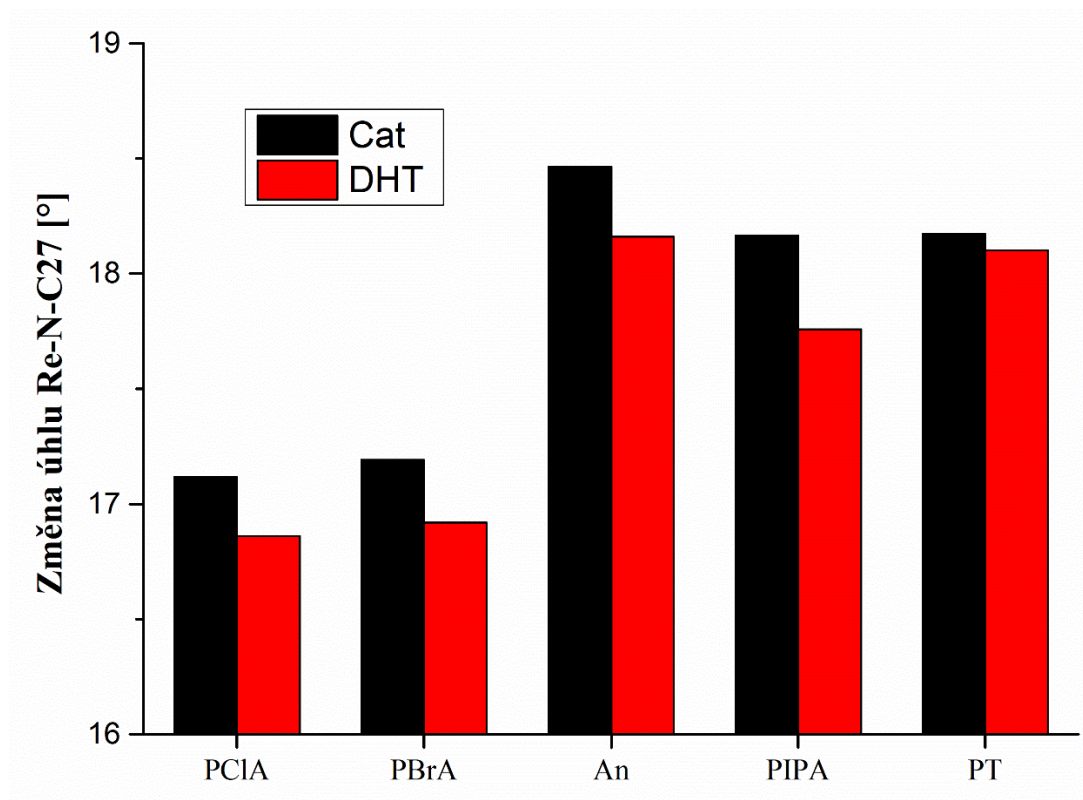
Z optimalizované struktury ionizovaného a neionizovaného komplexu (viz obrázek 14) je patrné, že během ionizace dochází k výrazné změně prostorového uspořádání komplexu vlivem negativního náboje na atomu dusíku. Pro popis této změny byl vybrán dihedrální úhel mezi atomy C14-O22-Re-O19 (viz obrázek 18) charakterizující polohu ligandů. V případě komplexů s katecholem byla změna dihedrálního úhlu u všech derivátů téměř identická a rozdíl mezi jednotlivými komplexy byl menší než jeden stupeň. U komplexů s DHT se změna

analogických dihedrálních úhlů lišila až o pět stupňů, což ale nijak zásadně neovlivnilo fragmentaci těchto látek při CID.



Obrázek 18 – Změna dihedrálního úhlu C14-O22-Re-O19 mezi ionizovanou a neionizovanou formou komplexu u komplexů s katecholem.

Po deprotonaci připravených derivátů také dochází k pozorovatelnému zvětšení úhlu mezi atomy Re-N-C27, což odpovídá změně polohy vázaného anilínu. Také v tomto případě lze konstatovat souvislost mezi zkrácením Re-N vazby a změnou tohoto úhlu. V zásadě platí, že čím kratší je vazba Re-N, tím více se zvětšuje úhel mezi atomy Re-N-C27 (viz obrázek 19). Toto chování je pravděpodobně způsobeno větším sterickým bráněním, ke kterému dochází při zkrácení vazby. Rovněž by tak bylo vysvětlitelné poněkud anomální postavení nesubstituovaného anilínu.



Obrázek 19 – Změna úhlu Re-N-C27 mezi ionizovanou a neionizovanou formou komplexů v závislosti na typu substituentu.

## 5. Závěr

Je možné konstatovat, že všechny vytčené cíle byly splněny. Byla popsána derivatizační reakce komplexů  $[\text{Re}(\text{O})\text{Cl}(\text{Cat})_2]$  a  $[\text{Re}(\text{O})\text{Cl}(\text{DHT})_2]$  se substituovanými aniliny. Derivatizace umožnila ionizaci obtížně ionizovatelných komplexů a jejich studium pomocí hmotnostní spektrometrie. Průběh reakce byl popsán pomocí ESI-MS a UV/Vis kinetického měření. Produkty byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.

K popisu fragmentačních mechanismů byly použity experimenty v kolizní cele. U všech připravených derivátů bylo pozorováno analogické fragmentační chování.

Struktura derivátů byla dále studována pomocí výpočetní chemie. Struktury ionizovaných a neionizovaných forem komplexů byly optimalizovány. Na základě změny délky vazby mezi ionizovanou a neionizovanou formou byla učiněna predikce štěpených vazeb při fragmentaci.



## 6. Použitá literatura

- [1] Leonidova, A., & Gasser, G.: Underestimated potential of organometallic rhenium complexes as anticancer agents. *ACS Chemical Biology*, **9**(10), 2180–2193. (2014)
- [2] Bauer, E. B., Haase, A. A., Reich, R. M., Crans, D. C., & Kühn, F. E.: Organometallic and coordination rhenium compounds and their potential in cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, **393**, 79–117. (2019)
- [3] Mao, G., Huang, Q., & Wang, C.: Rhenium-Catalyzed Annulation Reactions. *European Journal of Organic Chemistry*, **2017**(25), 3549–3564. (2017)
- [4] Zarkadoulas, A., Koutsouri, E., Kefalidi, C., & Mitsopoulou, C. A.: Rhenium complexes in homogeneous hydrogen evolution. *Coordination Chemistry Reviews*, **304–305**, 55–72. (2015)
- [5] Machura, B., Wolff, M., & Gryca, I.: Rhenium (V) oxocomplexes [ReOX (N–O) 2] and [ReOL (N–O) 2]<sup>+</sup>—Synthesis, structure, spectroscopy and catalytic properties. *Coordination Chemistry Reviews*, **275**, 154–164. (2014)
- [6] Štícha, M., Jelínek, I., Poláková, J., & Kaliba, D.: Characterization of Rhenium(V) Complexes with Phenols Using Mass Spectrometry with Selected Soft Ionization Techniques. *Analytical Letters*, **48**, 2329–2342. (2015)
- [7] Štícha, M., Kaliba, D., Jelínek, I., & Poláková, J.: Analytical study of rhenium complexes with pyrogallol and catechol. *Chemical Papers*, **71**(4), 819–830. (2017)
- [8] Munson, M. S. B., & Field, F. H.: Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction. *Journal of the American Chemical Society*, **88**(12), 2621–2630. (1966)
- [9] Hoffmann, E. De, & Stroobant, V.: *Mass Spectrometry - Principles and Applications* (3rd ed.). Wiley. (2007)
- [10] Gross, J. H. : *Mass Spectrometry. Handbook of Spectroscopy* (3rd ed.). Springer International Publishing. (2017)
- [11] Lemr, K., & Borovcová, L.: Chemical ionization. *Chemické Listy*, **114**(3), 163–168. (2020)
- [12] Field, F. H.: Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Accounts of Chemical Research*, **1**(2), 42–49. (1968)
- [13] Huang, E. C., Wachs, T., Conboy, J. J., & Henion, J. D.: ATMOSPHERIC PRESSURE IONIZATION MASS SPECTROMETRY. *Analytical Chemistry*, **62**(13), 713A-725A. (1990)
- [14] Bruins, A. P.: Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure.

- Mass Spectrometry Reviews*, **10**(1), 53–77. (1991)
- [15] Covey, T. R., Thomson, B. A., & Schneider, B. B.: Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrometry Reviews*, **28**(6), 870–897. (2009)
- [16] Cronan, P., *Introduction to Mass Spectrometry*. (2012) Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Introduction to LCMS.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Introduction%20to%20LCMS.pdf) [cit 24.4.2020]
- [17] Syage, J. A.: Mechanism of  $[M + H]^+$  formation in photoionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**(11), 1521–1533. (2004)
- [18] Kauppila, T. J., Kotiaho, T., Kostianen, R., & Bruins, A. P.: Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**(2), 203–211. (2004)
- [19] Robb, D. B., Covey, T. R., & Bruins, A. P.: Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **72**(15), 3653–3659. (2000)
- [20] Kauppila, T. J., Syage, J. A., & Benter, T.: Recent developments in atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **36**(3), 423–449. (2017)
- [21] Raffaelli, A., & Saba, A.: Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **22**(5), 318–331. (2003)
- [22] Wilm, M.: Principles of electrospray ionization. *Molecular and Cellular Proteomics*, **10**(7). (2011)
- [23] Taylor, G.: Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, **280**(1382), 383–397. (1964)
- [24] Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Chemistry, D. O., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., & Alice, M. B.: Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*, **49**, 2240–2249. (1968)
- [25] Meng, C. K., Mann, M., & Fenn, J. B.: Of protons or proteins - “A beam’s a beam for a” that.” (O.S. Burns).” *Zeitschrift für Physik D Atoms, Molecules and Clusters*, **10**(2–3), 361–368. (1988)
- [26] Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**(4926), 64–71. (1989)

- [27] Rayleigh, Lord: XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, **14**(87), 184–186. (1882)
- [28] Kebarle, P., & Verkcerk, U. H.: Electrospray: From Ions in solution to Ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews*, **28**(6), 898–917. (2009)
- [29] Kebarle, P., & Tang, L.: From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical chemistry*, **65**(22), 972A-986A. (1993)
- [30] Konermann, L., Ahadi, E., Rodriguez, A. D., & Vahidi, S.: Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, **85**(1), 2–9. (2013)
- [31] Iribarne, J. V., & Thomson, B. A.: On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, **64**(6), 2287–2294. (1976)
- [32] Thomson, B. A., & Iribarne, J. V.: Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*, **71**(11), 4451–4463. (1979)
- [33] Labowsky, M., Fenn, J. B., & Fernandez De La Mora, J.: A continuum model for ion evaporation from a drop: Effect of curvature and charge on ion solvation energy. *Analytica Chimica Acta*, **406**(1), 105–118. (2000)
- [34] Ahadi, E., & Konermann, L.: Ejection of solvated ions from electrosprayed methanol/water nanodroplets studied by molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, **133**(24), 9354–9363. (2011)
- [35] Iavarone, A. T., & Williams, E. R.: Mechanism of charging and supercharging molecules in electrospray ionization. *Journal of the American Chemical Society*, **125**(8), 2319–2327. (2003)
- [36] Hogan, C. J., Carroll, J. A., Rohrs, H. W., Biswas, P., & Gross, M. L.: Combined charged residue-field emission model of macromolecular electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, **81**(1), 369–377. (2009)
- [37] Heck, A. J. R., & Van Den Heuvel, R. H. H.: Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **23**(5), 368–389. (2004)
- [38] Fernandez De La Mora, J.: Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Analytica Chimica Acta*, **406**(1), 93–104. (2000)
- [39] Kaltashov, I. A., & Mohimen, A.: Estimates of protein surface areas in solution by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **77**(16). (2005)
- [40] Ahadi, E., & Konermann, L.: Modeling the behavior of coarse-grained polymer chains in charged water droplets: Implications for the mechanism of electrospray ionization.

- Journal of Physical Chemistry B*, **116**(1), 104–112. (2012) doi:10.1021/jp209344z
- [41] Konermann, L., Rodriguez, A. D., & Liu, J.: On the formation of highly charged gaseous ions from unfolded proteins by electrospray ionization. *Analytical Chemistry*, **84**(15), 6798–6804. (2012) doi:10.1021/ac301298g
- [42] Chung, J. K., & Consta, S.: Release mechanisms of poly(ethylene glycol) macroions from aqueous charged nanodroplets. *Journal of Physical Chemistry B*, **116**(19), 5777–5785. (2012) doi:10.1021/jp301577b
- [43] Higashi, T., & Ogawa, S.: Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI–MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **162**, 57–69. (2016) doi:10.1016/j.jsbmb.2015.10.003
- [44] Moriwaki, H.: Electrospray ionization mass spectrometric detection of low polar compounds by adding NaAuCl<sub>4</sub>. *Journal of Mass Spectrometry*, **51**(11), 1096–1102. (2016) doi:10.1002/jms.3822
- [45] Niessen, W. M. A.: State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (1999) doi:10.1016/S0021-9673(99)00480-X
- [46] Zaikin, V. G., & Halket, J. M.: Derivatization in mass spectrometry - 8. Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *European Journal of Mass Spectrometry*, **12**(2), 79–115. (2006) doi:10.1255/ejms.798
- [47] Van Berkel, G. J., & Asano, K. G.: Chemical Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 2. Aromatic and Highly Conjugated Molecules. *Analytical Chemistry*, **66**(13), 2096–2102. (1994) doi:10.1021/ac00085a027
- [48] Van Berkel, G. J., Quirke, J. M. E., Tigani, R. A., Dilley, A. S., & Covey, T. R.: Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 3. Electrochemically Ionizable Derivatives. *Analytical Chemistry*, **70**(8), 1544–1554. (1998) doi:10.1021/ac971348o
- [49] Quirke, J. M. E., Berkel, G. J. V., & Adams, C. L.: Chemical Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 1. Alkyl Halides, Alcohols, Phenols, Thiols, and Amines. *Analytical Chemistry*, **66**(8), 1302–1315. (1994) doi:10.1021/ac00080a016
- [50] Anderegg, R. J.: Derivatization in mass spectrometry: Strategies for controlling fragmentation. *Mass Spectrometry Reviews*, **7**(4), 395–424. (1988) doi:10.1002/mas.1280070403
- [51] Eggink, M., Wijtmans, M., Ekkebus, R., Lingeman, H., De Esch, I. J. P., Kool, J., ...

- Irth, H.: Development of a selective ESI-MS derivatization reagent: Synthesis and optimization for the analysis of aldehydes in biological mixtures. *Analytical Chemistry*, **80**(23), 9042–9051. (2008)
- [52] Niessen, W. M. A.: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (2nd ed.). New York: Marcel Dekker. (1999)
- [53] Gao, S., Zhang, Z. P., & Karnes, H. T.: Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **825**(2), 98–110. (2005)
- [54] Ming Ng, K., Ling Ma, N., & Wai Tsang, C.: Differentiation of isomeric polyaromatic hydrocarbons by electrospray Ag(I) cationization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**(18), 2082–2088. (2003)
- [55] Frenking, G., & Fröhlich, N.: The Nature of the Bonding in Transition-Metal Compounds. *Chemical Reviews*, **100**(2), 717–774. (2000)
- [56] Nikolova-Damyanova, B.: Retention of lipids in silver ion high-performance liquid chromatography: Facts and assumptions. *Journal of Chromatography A*, **1216**(10), 1815–1824. (2009)
- [57] Nikolova-Damyanova, B., & Momchilova, S.: Silver ion HPLC for the analysis of positionally isomeric fatty acids. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **25**(13–15), 1947–1965. (2002)
- [58] Momchilova, S., & Nikolova-Damyanova, B.: Stationary phases for silver ion chromatography of lipids: Preparation and properties. *Journal of Separation Science*, **26**(3–4), 261–270. (2003)
- [59] Duncan, K. D., Fang, R., Yuan, J., Chu, R. K., Dey, S. K., Burnum-Johnson, K. E., & Lanekoff, I.: Quantitative Mass Spectrometry Imaging of Prostaglandins as Silver Ion Adducts with Nanospray Desorption Electrospray Ionization. *Analytical Chemistry*, **90**(12), 7246–7252. (2018)
- [60] Bayer, E., Gfrörer, P., & Rentel, C.: Coordination-ionspray-MS (CIS-MS), a universal detection and characterization method for direct coupling with separation techniques. *Angewandte Chemie - International Edition*, **38**(7), 992–995. (1999)
- [61] Van Berkel, G. J., Quirke, J. M. E., & Adams, C. L.: Derivatization for electrospray ionization-mass spectrometry. 4. Alkenes and alkynes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **14**(10), 849–858. (2000)
- [62] Johnson, D. W.: Contemporary clinical usage of LC/MS: Analysis of biologically

- important carboxylic acids. *Clinical Biochemistry*, **38**(4), 351–361. (2005)
- [63] Higashi, T., & Shimada, K.: Derivatization of neutral steroids to enhance their detection characteristics in liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**(4), 875–882. (2004)
- [64] Honda, A., Hayashi, S., Hifumi, H., Honma, Y., Tanji, N., Iwasawa, N., ... Suzuki, K.: MPAI (Mass Probes Aided Ionization) method for total analysis of biomolecules by mass spectrometry. *Analytical Sciences*, **23**(1), 11–15. (2007)
- [65] Van Berkel, G. J., McLuckey, S. A., & Glish, G. L.: Preforming Ions in Solution via Charge-Transfer Complexation for Analysis by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **63**(18), 2064–2068. (1991)
- [66] Málková, N.: *Derivatizace obtížně ionizovatelných nenabitých komplexů rhenia pro možnost identifikace pomocí ESI-HRMS*. Univerzita Karlova. (2018)
- [67] Sleno, L., & Volmer, D. A.: Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**(10), 1091–1112. (2004)
- [68] Jennings, K. R.: The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. (2000)
- [69] Shukla, A. K., & Futrell, J. H.: Tandem mass spectrometry: Dissociation of ions by collisional activation. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**(9), 1069–1090. (2000)
- [70] McLuckey, S. A.: Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **3**(6), 599–614. (1992)
- [71] Levsen, K., & Schwarz, H.: Gas-phase chemistry of collisionally activated ions. *Mass Spectrometry Reviews*, **2**(1), 77–148. (1983)
- [72] Henderson, W., & McIndoe, J. S.: *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*. Wiley. (2005)
- [73] Douglas, D. J.: Mechanism of the collision-induced dissociation of polyatomic ions studied by triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Physical Chemistry*, **86**(2), 185–191. (1982)
- [74] Schrödinger, E.: An undulatory theory of the mechanics of atoms and molecules. *Physical Review*, **28**(6), 1049–1070. (1926)
- [75] Slavíček, P., & Muchová, E.: *Kvantová chemie: První čtení*. VŠCHT Praha. (2019)
- [76] Zelenský, T., Sklenovský, P., & Otyepka, M.: *Úlohy do cvičení z výpočetní chemie*. (2008) Dostupné z: <https://fch.upol.cz/skripta/momo/skripta.pdf>, [cit 1.5.2020]
- [77] Slater, J. C.: Atomic shielding constants. *Physical Review*, **36**(1), 57–64. (1930)
- [78] Šišťák, L., Ončák, M., & Slavíček, P.: *Stručný úvod do teoretické a počítačové chemie*.

- Dpístupné z: [http://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013999/Prirucka\\_TeorChem.pdf](http://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013999/Prirucka_TeorChem.pdf), [cit 5.5.2020]
- [79] Bím, D., Gutten, O., Chalupský, J., Srnec, M., & Rulíšek, L.: Teoretická bioanorganická chemie a spektroskopie. *Chemické Listy*, **110**(5), 354–364. (2016)
- [80] Koch, W., & Holthausen, M. C.: *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. Wiley-VCH Verlag. (2001)
- [81] Kim, K., & Jordan, K. D.: Comparison of density functional and MP2 calculations on the water monomer and dimer. *Journal of Physical Chemistry*, **98**(40), 10089–10094. (1994)
- [82] Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F., & Frisch, M. J.: Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *Journal of Physical Chemistry*<sup>®</sup>, **98**(45), 11623–11627. (1994)
- [83] Becke, A. D.: Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, **98**(7), 5648–5652. (1993)
- [84] Lee, C., Yang, W., & Parr, R. G.: Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B*, **37**(2). (1988)
- [85] De Hoffmann, E.: Tandem mass spectrometry: A primer. *Journal of Mass Spectrometry*, **31**(2). (1996)
- [86] Alex, A., Harvey, S., Parsons, T., Pullen, F. S., Wright, P., & Riley, J.-A.: Can density functional theory (DFT) be used as an aid to a deeper understanding of tandem mass spectrometric fragmentation pathways? *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **23**(17), 2619—2627. (2009)
- [87] Heinonen, M., Rantanen, A., Mielikäinen, T., Kokkonen, J., Kiuru, J., Ketola, R. A., & Rousu, J.: FiD: a software for ab initio structural identification of product ions from tandem mass spectrometric data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **22**(19), 3043–3052. (2008)
- [88] Hufsky, F., & Böcker, S.: Mining molecular structure databases: Identification of small molecules based on fragmentation mass spectrometry data. *Mass Spectrometry Reviews*, **36**(5), 624–633. (2017)
- [89] Wright, P., Alex, A., Nyaruwata, T., Parsons, T., & Pullen, F.: Using density functional theory to rationalise the mass spectral fragmentation of maraviroc and its metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **24**(7), 1025–1031. (2010)
- [90] Rasche, F., Svatoš, A., Maddula, R. K., Böttcher, C., & Böcker, S.: Computing fragmentation trees from tandem mass spectrometry data. *Analytical Chemistry*, **83**(4),

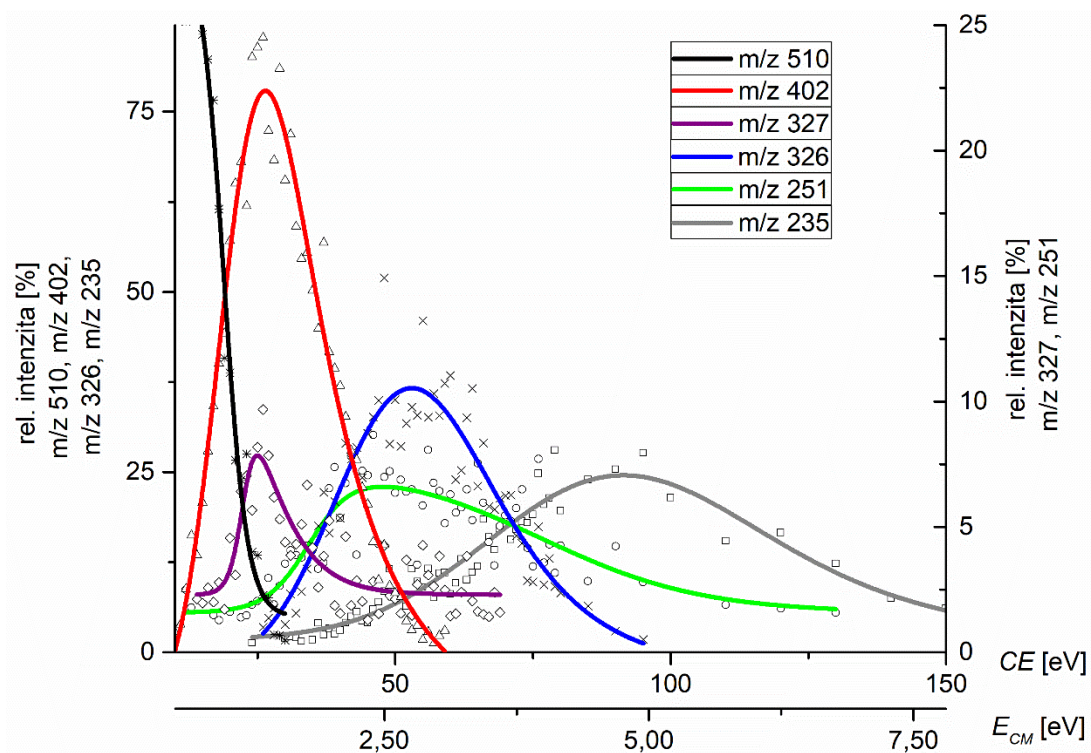
- 1243–1251. (2011)
- [91] Bandu, M. L., Watkins, K. R., Bretthauer, M. L., Moore, C. A., & Desaire, H.: Prediction of MS/MS Data. 1. A Focus on Pharmaceuticals Containing Carboxylic Acids. *Analytical Chemistry*, **76**(6), 1746–1753. (2004)
- [92] Klagkou, K., Pullen, F., Harrison, M., Organ, A., Firth, A., & Langley, G. J.: Fragmentation pathways of sulphonamides under electrospray tandem mass spectrometric conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**(21). (2003)
- [93] Klagkou, K., Pullen, F., Harrison, M., Organ, A., Firth, A., & Langley, G. J.: Approaches towards the automated interpretation and prediction of electrospray tandem mass spectra of non-peptidic combinatorial compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**(11), 1163–1168. (2003)
- [94] Alcamí, M., M<sup>o</sup>, O., & V<sup>a</sup>ñez, M.: Computational chemistry: A useful (sometimes mandatory) tool in mass spectrometry studies. *Mass Spectrometry Reviews*, **20**(4). (2001)
- [95] Wright, P., Alex, A., & Pullen, F.: Predicting collision-induced dissociation mass spectra: Understanding the role of the mobile proton in small molecule fragmentation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **30**(9), 1163–1175. (2016)
- [96] Holman, S. W., Wright, P., & Langley, G. J.: High-throughput approaches towards the definitive identification of pharmaceutical drug metabolites. 1. Evidence for an ortho effect on the fragmentation of 4-benzenesulfinyl-3-methylphenylamine using electrospray ionisation mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, **22**(15), 2355–2365. (2008)
- [97] Wright, P. A., Alex, A., & Pullen, F.: Predicting collision-induced dissociation spectra: Semi-empirical calculations as a rapid and effective tool in software-aided mass spectral interpretation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **28**(10), 1127–1143. (2014)
- [98] Wright, P. A., Alex, A., & Pullen, F. S.: Can computational chemistry be used to predict CID fragmentation of anions? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **29**(23), 2309–2315. (2015)
- [99] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. E., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., ... Fox, J. D.: Gaussian 16. *Gaussian, Inc., Wallingford CT*. (2016)
- [100] Hay, P. J., & Wadt, W. R.: Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, **82**(1), 299–310. (1985)



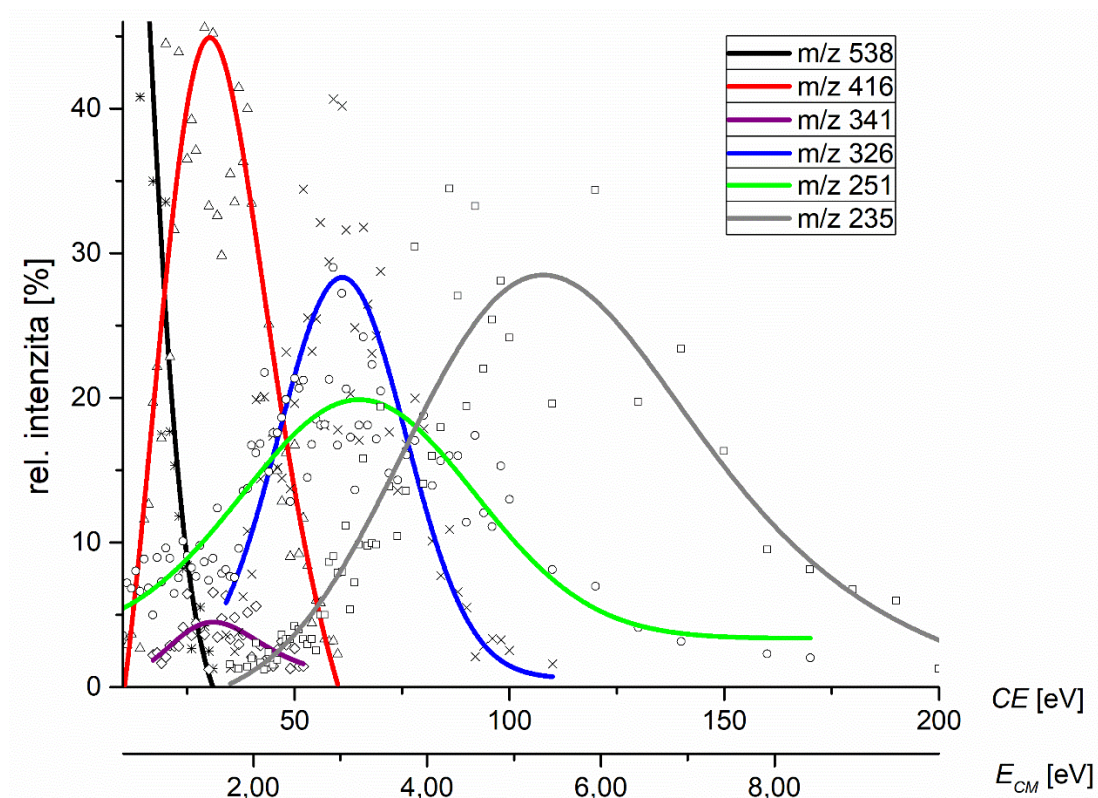
- [101] Hay, P. J., & Wadt, W. R.: Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *The Journal of Chemical Physics*, **82**(1), 270–283. (1985)
- [102] Wadt, W. R., & Hay, P. J.: Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *The Journal of Chemical Physics*, **82**(1), 284–298. (1985)

## 7. Přílohy

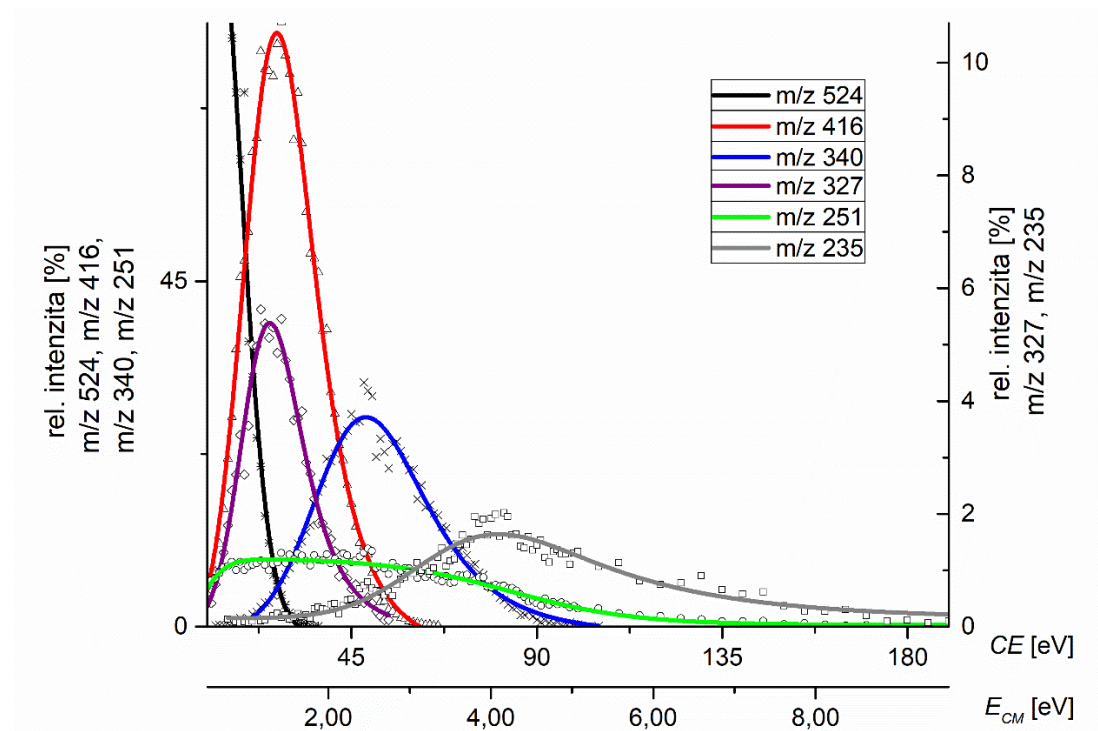
### 7.1. Příloha A – CID diagramy



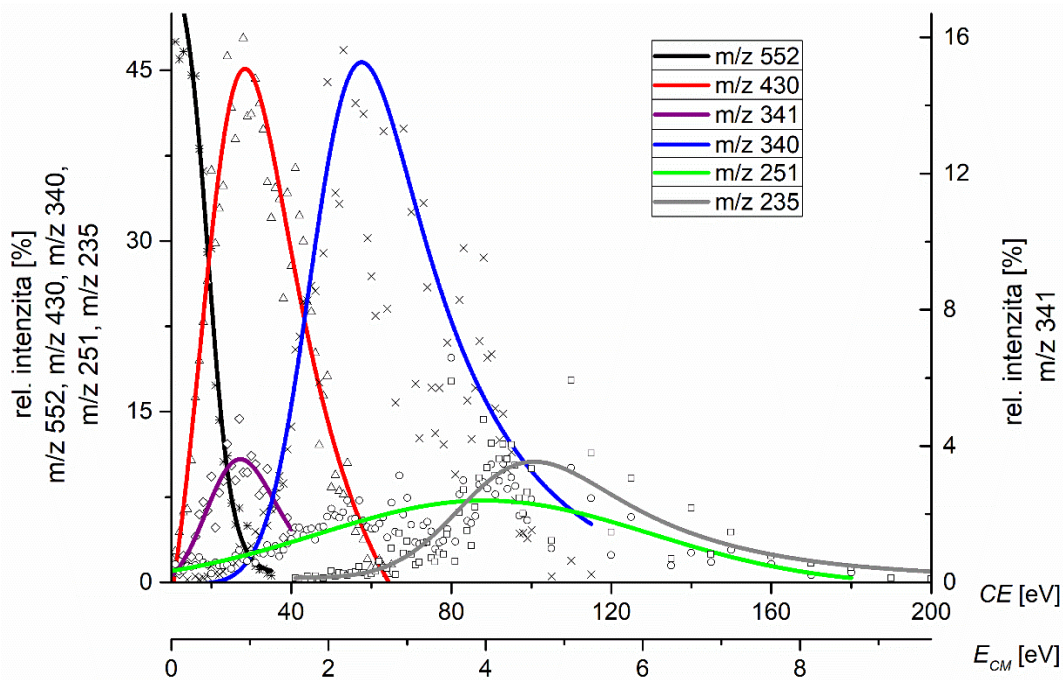
Obrázek 20 – Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{An}]^-$  na kolizní energii, resp. těžišťové kolizní energii.



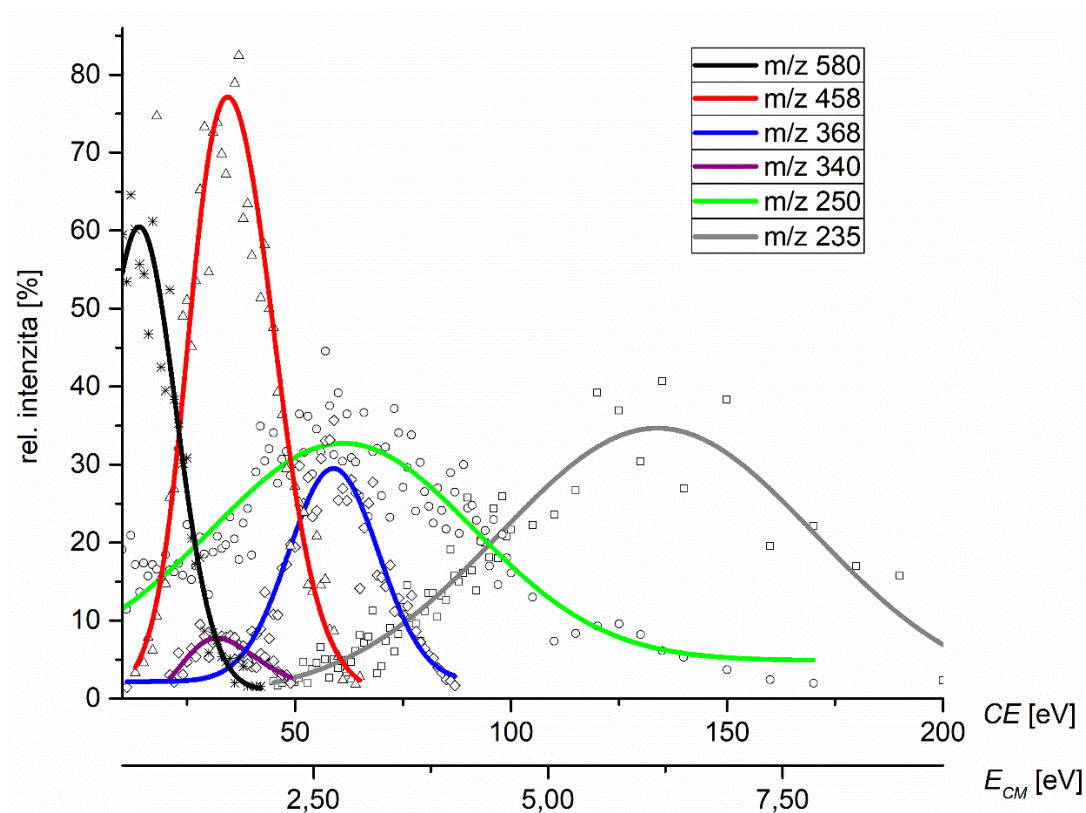
Obrázek 21 – Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{An}]^-$  na kolizní energii, resp. těžišťové kolizní energii.



Obrázek 22 – Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PT}]^-$  na kolizní energii, resp. těžišťové kolizní energii.

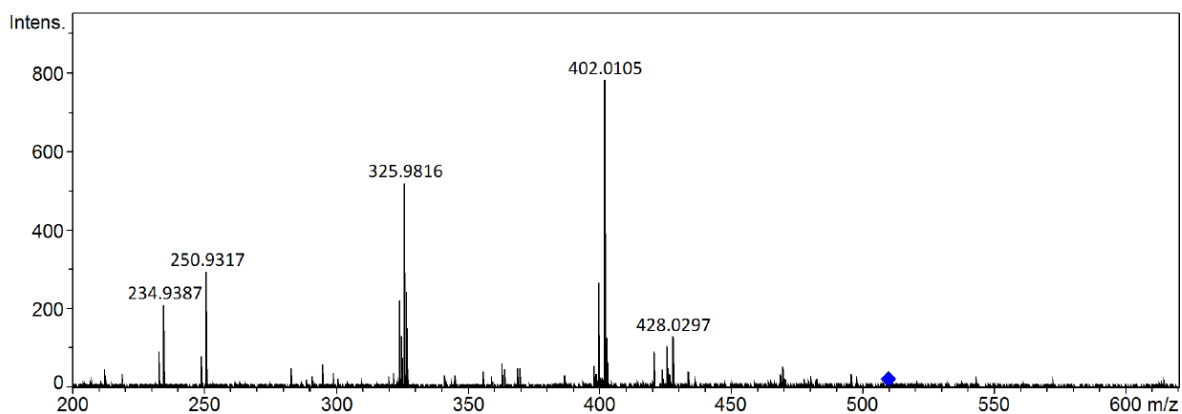


Obrázek 23 – Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PT}]^-$  na kolizní energii, resp. těžišťové kolizní energii.

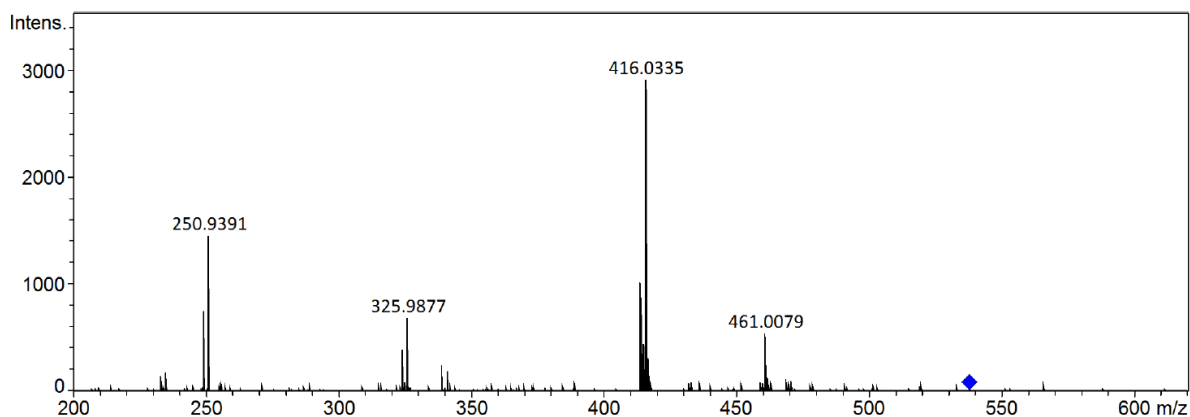


Obrázek 24 – Graf závislosti relativní intenzity iontů vzniklých fragmentací  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PIPA}]^-$  na kolizní energii, resp. těžišťové kolizní energii.

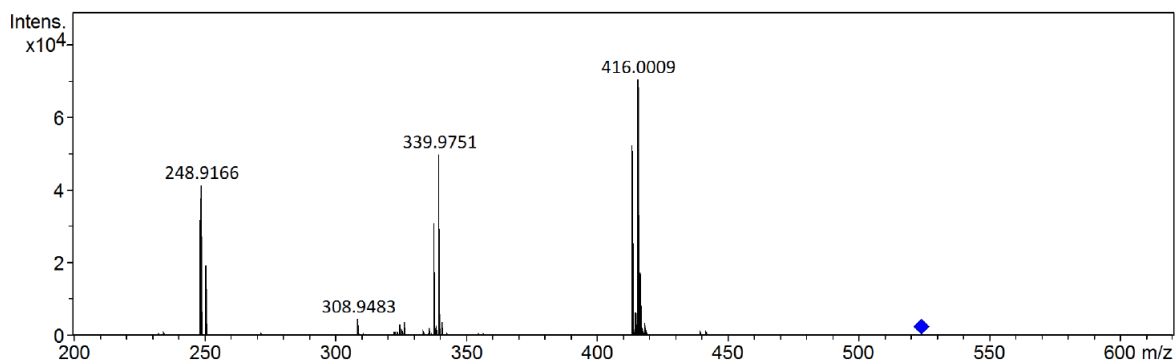
## 7.2. Příloha B – MS/MS spektra



Obrázek 25 – MS/MS spektrum derivátu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{An}]$  při kolizní energii 40 eV.

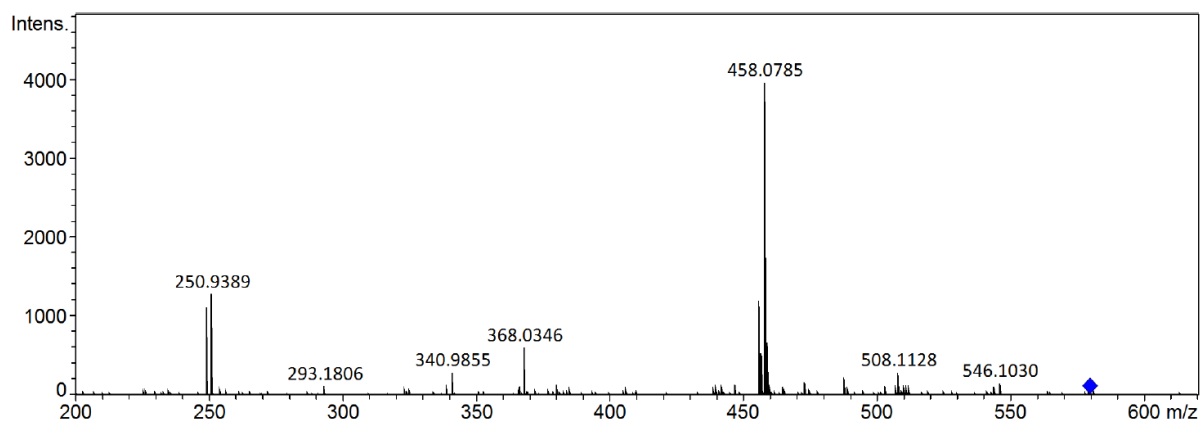


Obrázek 26 – MS/MS spektrum derivátu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{An}]$  při kolizní energii 40 eV.



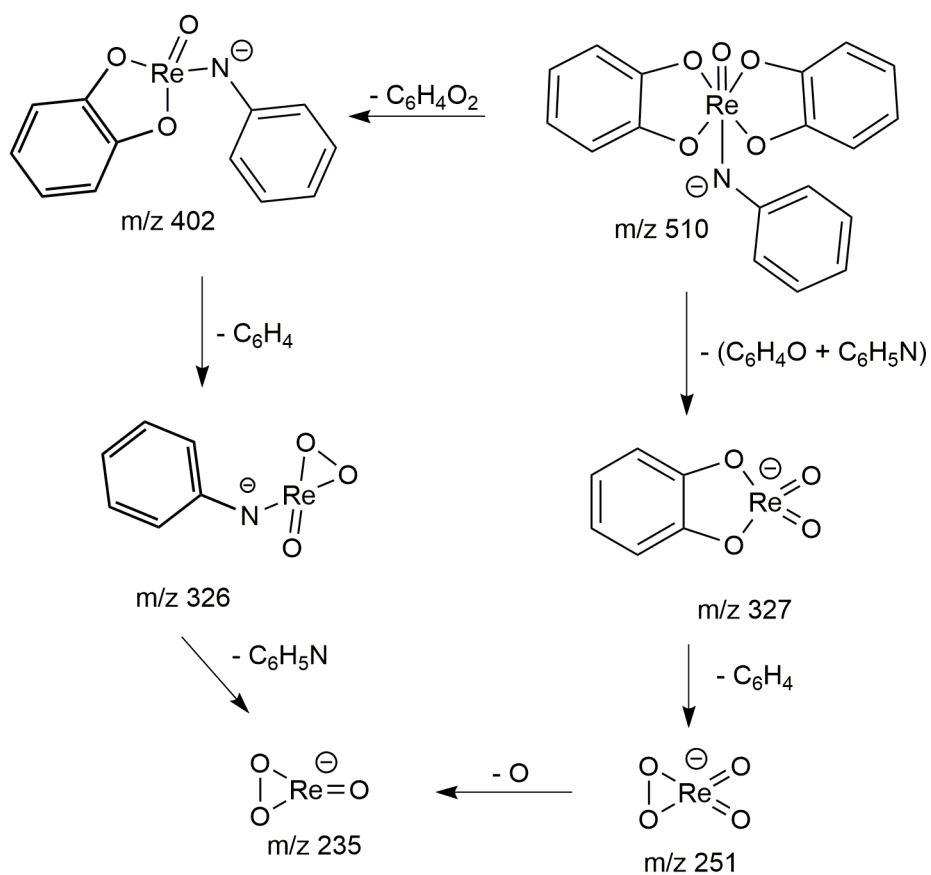
Obrázek 27 – MS/MS spektrum derivátu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PT}]$  při kolizní energii 40 eV.



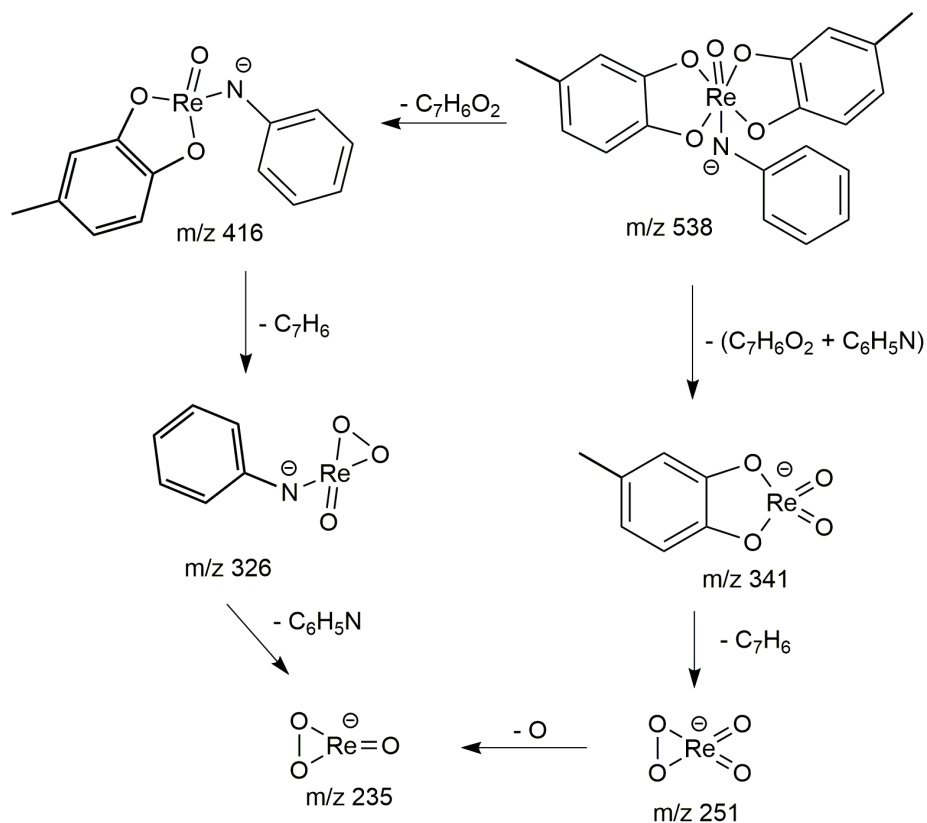


Obrázek 28 – MS/MS spektrum derivátu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PIPA}]$  při kolizní energii 40 eV.

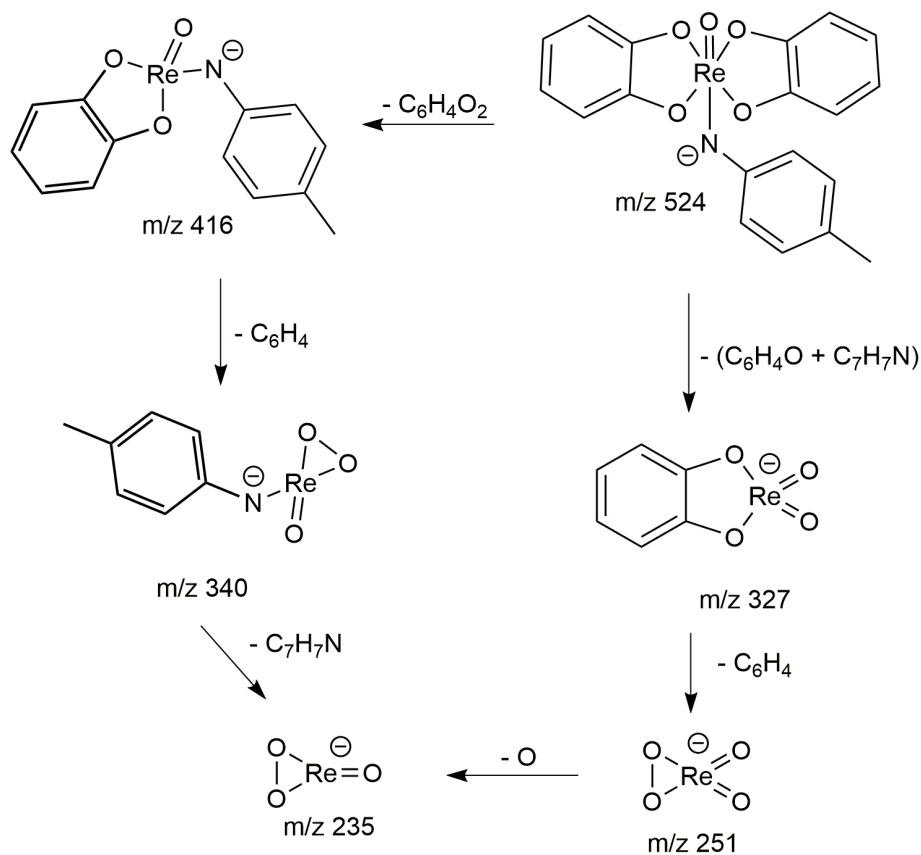
### 7.3. Příloha C – Fragmentační schémata



Obrázek 29 – Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{An}]^-$ .

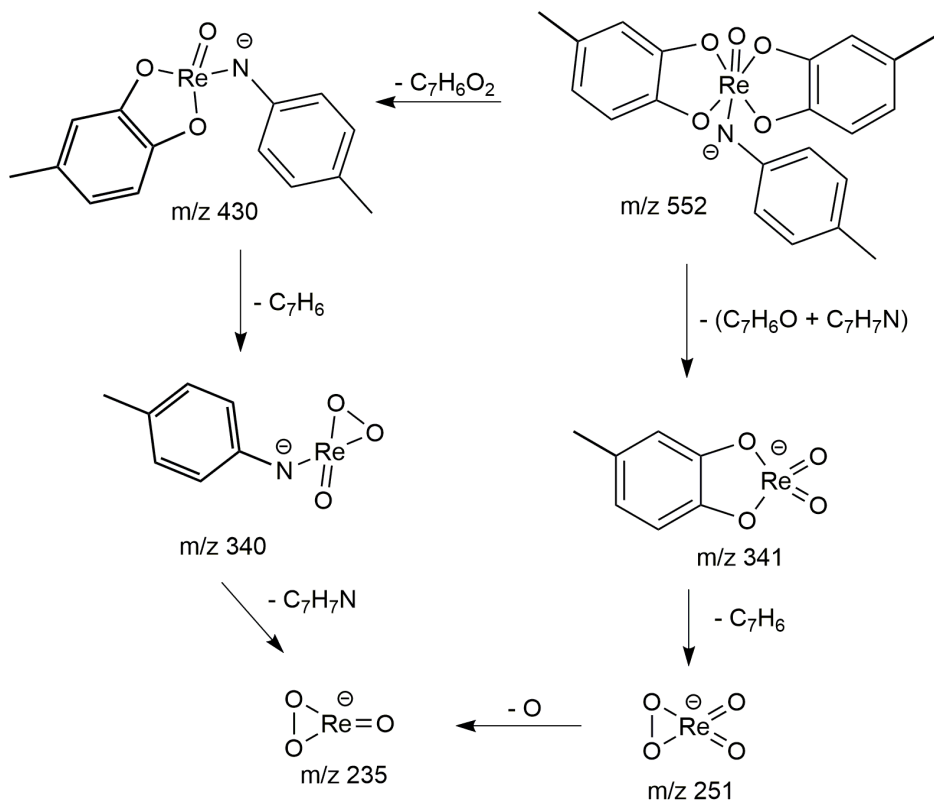


Obrázek 30 – Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{An}]^-$ .

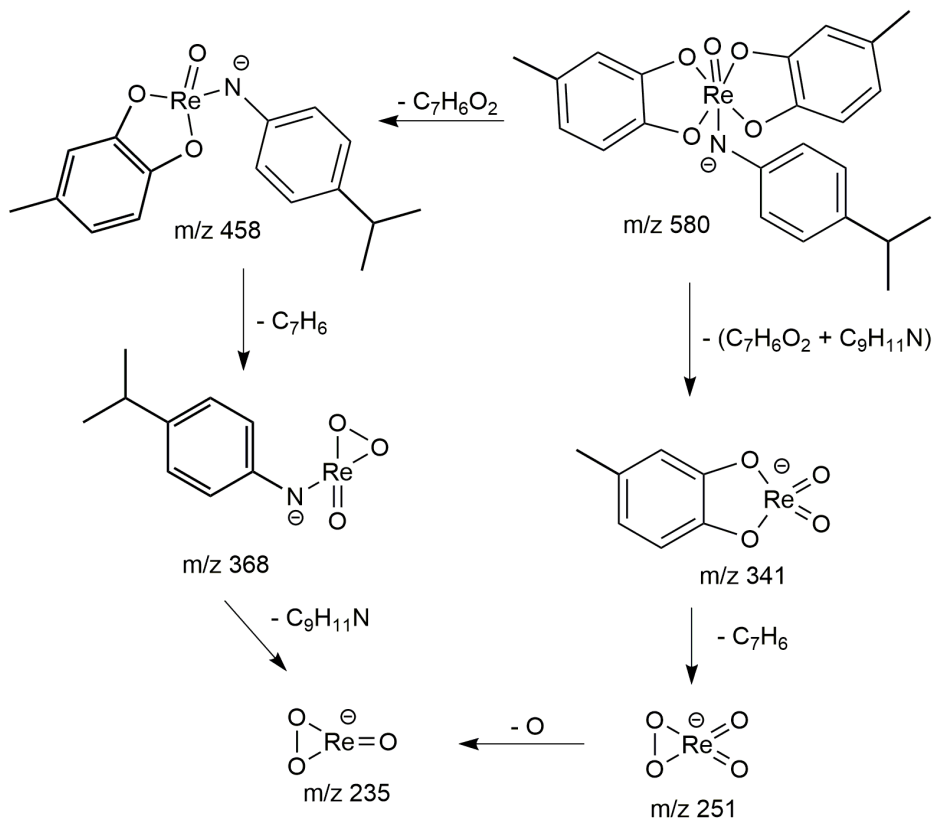


Obrázek 31 – Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{Cat})_2\text{PT}]^-$ .





Obrázek 32 – Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PT}]^-$ .



Obrázek 33 – Fragmentační schéma komplexu  $[\text{Re}(\text{O})(\text{DHT})_2\text{PIPA}]^-$ .